

明細書

アフィニティー樹脂

技術分野

本発明は、アフィニティークロマトグラフィー用の固相担体として有用な樹脂（以下、単にアフィニティー用樹脂ともいう）および当該樹脂を調製するのに好適なモノマーに関する。より詳しくは、非特異的タンパク質の吸着が少なく、且つ安定性の高いアフィニティー用樹脂に関する。

背景技術

近年、特異的分子間相互作用を基盤とした手法を用い、ある特定の分子に特異的な相互作用を有する分子を探索する試みが盛んに行われている。この中で、注目に値する生理活性を示す医薬品のような低分子化合物を適当な固相担体に固定化し、ターゲットを探索する方法が注目を集めている。このいわゆるアフィニティー樹脂と呼ばれる手法を用いたターゲット探索研究は着目する生理活性を示す低分子化合物のターゲットを効率的に同定することが可能であることから多くの研究が行われ、具体的な成果もいくつか報告されている。これらの研究例としては、1) 1989年のシュライバー教授による免疫抑制剤FK506の結合タンパク質FKBP (FK506 binding proteins) の発見 (FK506の細胞内結合タンパク質としてのFKBP12の発見、「Nature, 英国, 1989年10月26日, 第341巻, p. 758-760」参照) や、2) 抗癌剤Trapoxinのターゲットタンパク質としてのHDAC発見 (「Science, 米国, 1996年4月19日, 第272巻, p. 408-411」 参照) 、3) 半田等によるE3330のターゲットタンパクとしてのRef-1の発見 (「Nature Biotechnology, 英国, 2000年8月, 第18巻, 第8号, p. 877-881」 参照) が有名である。

また、診断薬の領域においても、出来るだけ病気早期に病巣の存在を非侵襲的に確認できれば治療の効果がアップすることから、例えば特定の癌に特異的に発現する微量タンパク質等のマーカーと呼ばれる物質を、採取した患者の血液等から同定

する研究も盛んに行われている。

しかし、これまでに上記手法において、固定化したリガンド分子と特異的な分子間相互作用を行うタンパク質以外の非特異的タンパク質の存在が問題となってきた。本発明者らは、リガンドをアフィニティー樹脂に結合させる際に親水性スペーサーを介在させることによって、固定化したリガンド分子および／またはアフィニティー樹脂自身と、該リガンドに対して特異的でない分子との非特異的な相互作用を低減させることを既に見出している（特願2002-222226（WO 2004/025297））。しかしながら、非特異的な相互作用の低減化という点のみ考えた場合には、アガロース系アフィニティー樹脂（例えばAffiGel）のように固相担体自身が高い親水性を有する方がアフィニティー樹脂としては優れていることになる。しかしながらアガロース系樹脂はその構成成分の化学的特性から通常合成で用いる多くの系で不可逆的な変性を引き起こし、広範なリガンドの研究には必ずしも適しているとは言えない欠点を有している。安定性という観点からは、メタクリレート系の樹脂（例えばTOYOPEARL）が、化学的にも安定で多くの有機溶媒内での反応に十分な耐性を有している。

分子間の非特異的な相互作用がアガロース系アフィニティー樹脂に匹敵する程低減化され、且つメタクリレート系樹脂に匹敵する程の安定性を有する樹脂の開発が求められていた。

本発明は、分子間の非特異的相互作用が低減化され得る、且つ安定性に優れた樹脂、特にアフィニティー樹脂を提供することを目的とする。

発明の開示

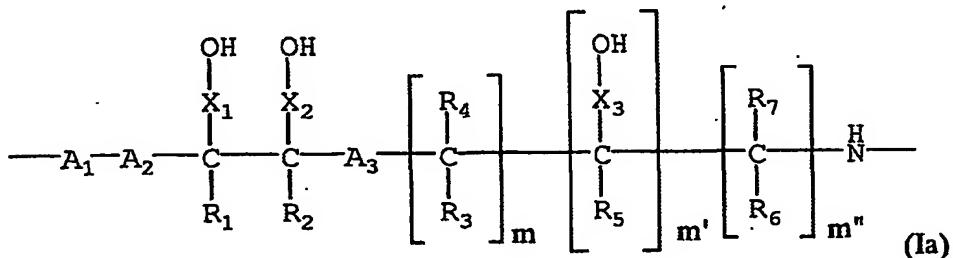
本発明者らは、上記課題を解決すべく銳意研究し、これまでに開発してきた親水性スペーサー（特願2002-222226（WO 2004/025297））が組み込まれたメタクリレートモノマーを樹脂原料とし、それを重合反応に付すことにより、メタクリレート系の樹脂ではあるが、アガロース系樹脂に匹敵する親水的特性を有するアフィニティー用樹脂の合成を試み、それに成功して本発明を完成するに至った。

即ち本発明は下記の通りである。

[1] 原料となるモノマーを重合して得られる樹脂であつて、該モノマーには親水性スペーサーが組み込まれていることを特徴とする樹脂。

[2] モノマーが(メタ)アクリル系モノマーである、上記[1]記載の樹脂。

5 [3] 親水性スペーサーが下記式(Ia)～(Ie)からなる群より選択されるいづれか1つの式で表される部分構造を少なくとも1つ有するものである、上記[1]または[2]記載の樹脂。



(式(Ia)中、

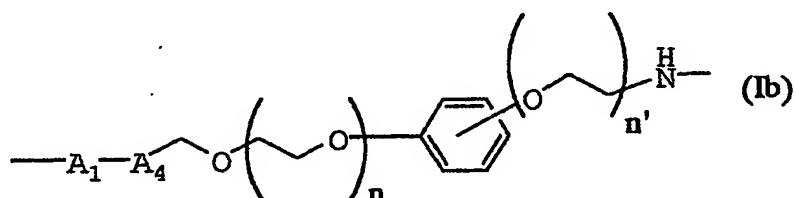
10 A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、 A_2 は単結合または低級アルキレン基であり、 A_3 は適当な連結基であり、

X_1 ～ X_3 はそれぞれ同一または異なつて単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

15 R_1 ～ R_7 はそれぞれ同一または異なつて水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-CH_2OH$ あるいは水酸基であり、

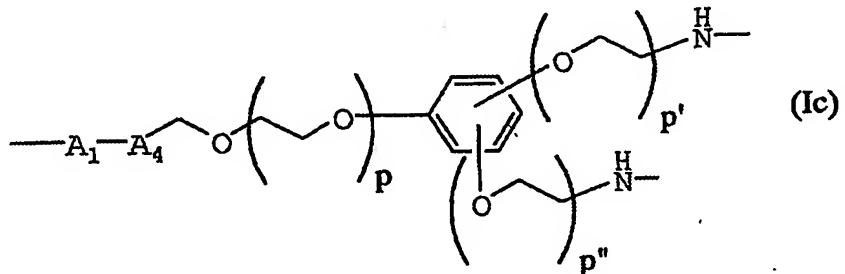
m は0～2の整数であり、 m' は0～10の整数であり、 m'' は0～2の整数であり、

R_3 ～ R_7 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なつていてもよい、 X_3 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なつていてもよい；



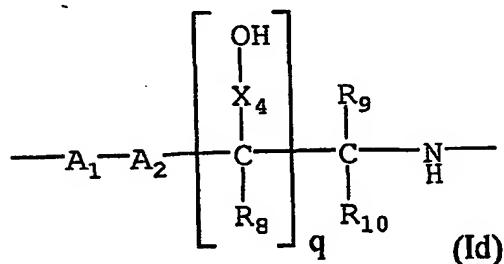
(式 (I b) 中、

A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、 A_4 は低級アルキレン基であり、
 n および n' はそれぞれ同一または異なって 1 ～ 10 の整数である)；



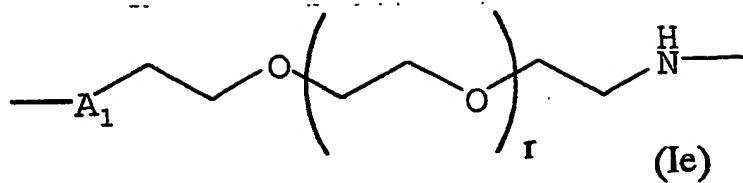
5 (式 (I c) 中、

A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、 A_4 は低級アルキレン基であり、
 p 、 p' および p'' はそれぞれ同一または異なって 1 ～ 10 の整数である)；



(式 (I d) 中、

10 A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、 A_2 は単結合または低級アルキレン基であり、
 X_4 は単結合あるいは炭素数 1 ～ 3 の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換され
ていてもよいメチレン基であり、
 R_8 ～ R_{10} はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数 1 ～ 3 の直鎖状または分
枝状のアルキル基、 $-CH_2OH$ あるいは水酸基であり、
15 q は 1 ～ 7 の整数であり、
 R_8 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよく、 X_4 が複数個
存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよい)；

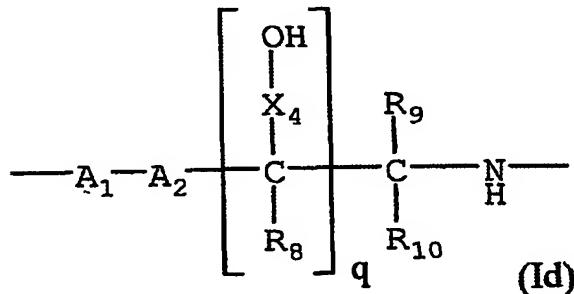


(式 (I e) 中、

A_1 は $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ であり、

r は $1 \sim 10$ の整数である)

5 [4] 親水性スペーサーが下記式 (I d) で表される部分構造を少なくとも 1 つ有するものである、上記 [3] 記載の樹脂。



(式 (I d) 中、

A_1 は $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ であり、 A_2 は単結合または低級アルキレン基であり、

10 X_4 は単結合あるいは炭素数 $1 \sim 3$ の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

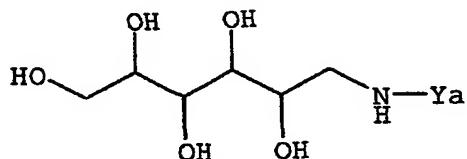
$R_8 \sim R_{10}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数 $1 \sim 3$ の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

q は $1 \sim 7$ の整数であり、

15 R_8 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよく、 X_4 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよい)

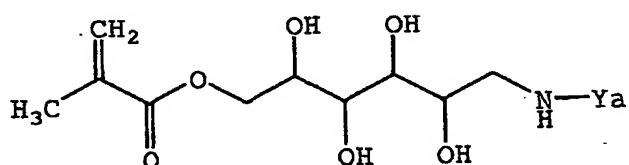
[5] 式 (I d) において、 A_1 が $-\text{O}-$ であり、 A_2 がメチレン基であり、 X_4 が単結合であり、 q が 4 であり、複数個存在する R_8 が同一で水素原子であり、 R_9 および R_{10} が水素原子である、上記 [4] 記載の樹脂。

[6] 親水性スペーサーが、下記式で表される化合物である、上記〔1〕記載の樹脂。



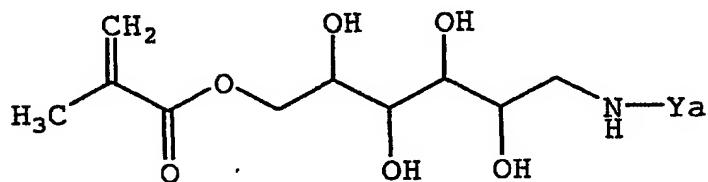
(式中 Y_a は水素原子またはアミノ基の保護基である)

5 [7] 下記式で表される化合物の共重合体を含む、上記〔5〕記載の樹脂。



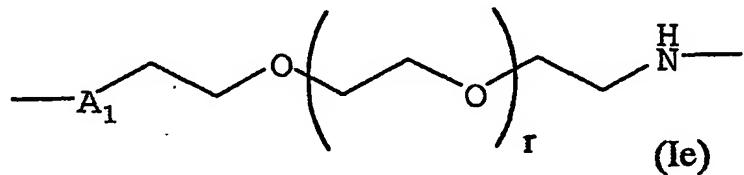
(式中 Y_a は水素原子またはアミノ基の保護基である)

[8] 下記式で表される化合物。



10 (式中 Y_a は水素原子またはアミノ基の保護基である)

[9] 親水性スペーサーが下記式 (I e) で表される部分構造を少なくとも 1 つ有するものである、上記〔3〕記載の樹脂。



(式 (I e) 中、

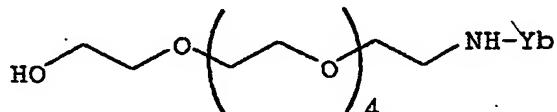
A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、

r は 1 ~ 10 の整数である)

[10] 式 (I e) において、 A_1 が $-O-$ である、上記 [9] 記載の樹脂。

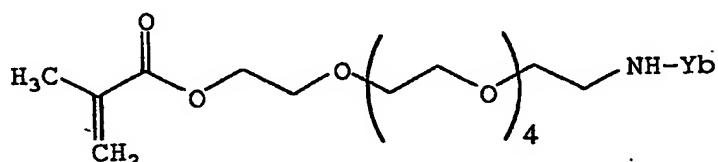
〔11〕 親水性スペーサーが、下記式で表される化合物である、上記〔1〕記載の

5 樹脂。



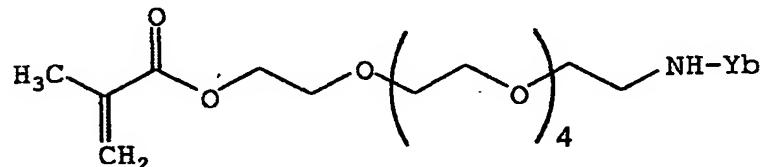
(式中 Y b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

[12] 下記式で表される化合物の共重合体を含む、上記〔10〕記載の樹脂。



10 (式中Y b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

[13] 下記式で表される化合物。



(式中Y b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

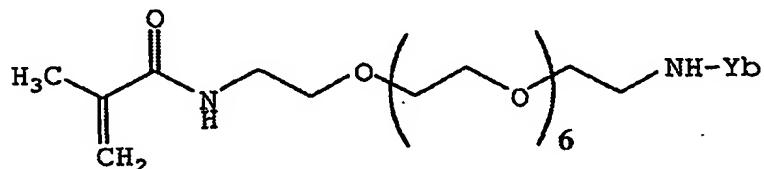
[14] 式 (I e) において、 A_1 が $-\text{NH}-$ である、上記 [9] 記載の樹脂。

〔15〕親水性スペーサーが、下記式で表される化合物である、上記〔1〕記載の樹脂。



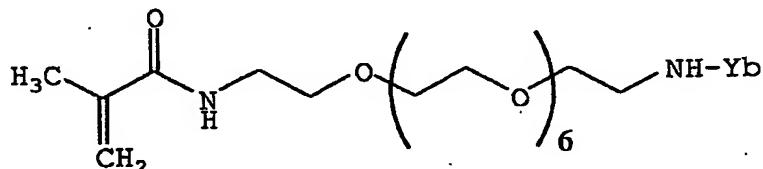
(式中 Y b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

[16] 下記式で表される化合物の共重合体を含む、上記〔14〕記載の樹脂。



(式中Y b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

5 [17] 下記式で表される化合物。



(式中 Y b. は水素原子またはアミノ基の保護基である)

[18] 上記 [1] ~ [7]、[9] ~ [12] および [14] ~ [16] のいずれか 1 つに記載の樹脂にリガンドを固定化してなる、アフィニティークロマトグラフイー用固相担体。

〔19〕該リガンドのターゲット分子探索用である、上記〔18〕記載の固相担体。

〔20〕リガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子のスクリーニング方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法：

(i) リガンドを上記 [1] ~ [7]、[9] ~ [12] および [14] ~ [16] のいずれか1つに記載の樹脂に固定化する工程、

(i i) ターゲット分子を含むかまたは含まない試料を上記 (i) で得られたリガンドが固定化された樹脂に接触させる工程。

(i i i) リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を同定) 解析する工程 および

(i v) 上記 (i ii) で得られた解析結果に基づいてリガンドに対して特異的な相互作用を有する分子をターゲット分子と判断する工程。

[21] 試料中の、リガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子を測定する方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法：

(i) リガンドを上記 [1] ~ [7]、[9] ~ [12] および [14] ~ [16] のいずれか1つに記載の樹脂に固定化する工程、

5 (ii) 試料を上記 (i) で得られたリガンドが固定化された樹脂に接触させる工程、

(iii) リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかつた分子を測定し、解析する工程、および

10 (iv) 上記 (iii) で得られた解析結果に基づいてリガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子を測定する工程。

図面の簡単な説明

図1は、親水性スペーサーを組み込んだモノマー成分を重合してなる樹脂にリガンド (FK506) を固定化することによって得られるFK506固定化固相担体上へのタンパク質の非特異的な吸着の程度を示す図である。FK506のターゲット分子であるFKBP12の値を1とした場合の各非特異的タンパク質の吸着の程度を相対的に表した。

発明の詳細な説明

本発明の樹脂を合成するにあたって使用されるモノマーは、親水性スペーサーが組み込まれていて、且つ化学的、物理的に安定な重合体を形成することができるものであればベースとなる構造は特に限定されないが、好ましくは(メタ)アクリル酸のエステルあるいはアミドである。便宜上、親水性スペーサーが導入されているモノマーを親水性モノマーと称する。

本発明において「樹脂」とは、上記したモノマーの重合体を含むものであって、通常、当分野で使用し得る程度の形状や物理化学的性質を有するものであれば特に限定されない。例えばアフィニティークロマトグラフィー操作において、カラム等に充填し得る形状や物理化学的性質、あるいは遠心操作により溶液と分離できるような形状や物理的性質を有するものが好ましく使用される。

本発明において、「親水性スペーサー」とは、樹脂と、当該樹脂に固定化されるリガンド分子との間に介在する基となる物質であって、親水性である。親水性の程度については後述する。ここで「介在する」とは、該親水性スペーサーが、樹脂の構成成分であるモノマー中に存在する官能基からリガンド内に存在する官能基までの間に存在することを意味する。該親水性スペーサーは、その一端をモノマー中の官能基と結合し、他端をリガンド内の官能基と結合する。また当該親水性スペーサーは、結果的に樹脂と固定化されるリガンドとの間に介在する基として機能し得るものであれば2以上の化合物を順次、結合、重合させることによって得られるものであっても構わない。モノマー中への親水性スペーサーの組み込みは、例えば親水性モノマーとして親水性スペーサーが組み込まれた(メタ)アクリル系モノマーを調製する場合には、アクリル酸あるいはメタクリル酸の酸ハライドと対応する親水性スペーサーとの反応あるいはアクリル酸あるいはメタクリル酸と通常のアミド結合あるいはエステル形成反応等によって合成されるアミド、エステル等の共有結合あるいは非共有結合であり、いずれも当分野で公知の材料ならびに反応によって行なわれる。

本発明において使用する親水性スペーサーとしては、得られ得る樹脂の表面の疎水的な性質を変化させ、非特異的な分子間相互作用を排除するかあるいは抑制するようなものであれば特に限定されないが、好ましくは樹脂(より詳しくは樹脂を構成するモノマー)およびリガンドと結合した状態(以下、この様な状態にある親水性スペーサーを便宜上「親水性スペーサー部分」と称する)で水素結合アクセプター(HBA; hydrogen bond acceptor)数が2以上、水素結合ドナー(HBD; hydrogen bond donor)数が1以上であり、通常、HBA数が2~12程度、HBD数が1~12程度のものである。より好ましくは樹脂およびリガンドと結合した状態でHBA数が6以上であるか、HBD数が5以上であるか、あるいは該スペーサー1分子あたりのHBA数およびHBD数の総計が9以上となるような化合物である。またこれらの条件を2つもしくは全て満たすような化合物であってもよい。

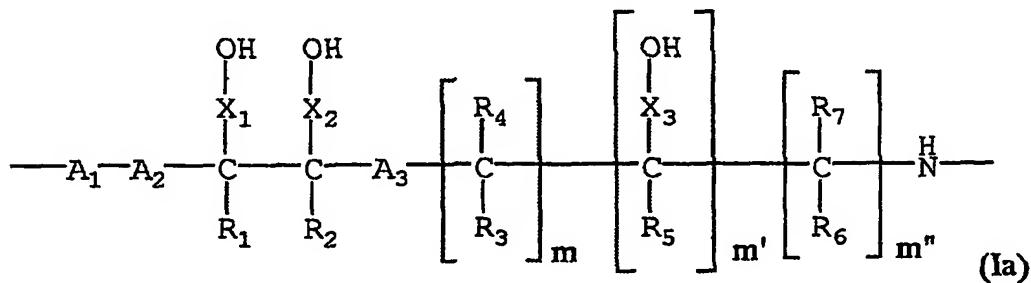
ここで、水素結合アクセプター数（HBA数）とは、含まれる窒素原子（N）と酸素原子（O）の総数であり、水素結合ドナー数（HBD数）とは、含まれるNHとOHの総数である（C. A. Lipinski et al., Advanced Drug Delivery Reviews 23 (1997) 3-25）。本発明においては、樹脂とリガンドとの間に介在する基であっても、メタクリル酸クロライド等のモノマー合成の出発原料としての化合物に由来するNやO、あるいはNHやOHはそれぞれHBA数やHBD数に含めない。さらに親水性スペーサーに由来するものであってもメタクリル酸クロライド等との結合に直接利用されるアミノ基や水酸基に由来するNやO、あるいはNHやOHもそれぞれHBA数やHBD数に含めない。リガンドと親水性スペーサーとの結合をより容易にする為にリガンドと親水性スペーサーの間に任意の基を固定化の前にあらかじめリガンドに結合あるいは導入することができる（当該基をリンカーともいう）が、これらはリガンドに応じて適宜選択されるものであって、固相担体の疎水的な性質の緩和への寄与が少ないと考えられるので、当該基に含まれるNやO、あるいはNHやOHも本発明におけるHBD数やHBA数には含めない。尚、リンカーの導入には、アミド結合や縮合、シップ塩基、C-C結合、エステル結合、水素結合、疎水相互作用等の種々の共有結合あるいは非共有結合が利用され、いずれも当分野で公知の材料ならびに反応により実施される。

本願発明の状況下では親水性スペーサーのHBA数は2以上（通常2～12）、HBD数は1以上（通常1～12）である。非特異的な相互作用を十分に抑制するためには（i）HBA数が6以上、（ii）HBD数が5以上、（iii）HBA数とHBD数の総計が9以上、というこれらの条件を少なくとも1つ、好ましくは2つ以上満たすことが好ましい。本発明において親水性スペーサーのHBD数あるいはHBA数の上限は、最終的に当該親水性スペーサーが組み込まれたモノマーを重合して樹脂が合成できれば特に制限されるものではなく、通常、上記したようにそれぞれ12程度である。

さらに本発明において使用する親水性スペーサーは、それ自体非特異的な相互作

用（例えば該スペーサーへのタンパク質の吸着等）を生じるものでないことが好ましい。具体的には、該スペーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になるような官能基を有さないことであり、当該官能基としてはアミノ基（ただし、該アミノ基に該アミノ基の塩基性を減弱させる官能基（例えばカルボニル基、スルホニル基）が結合している場合は除く）、カルボキシル基、硫酸基、硝酸基、ヒドロキサム酸基等が挙げられる。ここで水溶液中とは、具体的には、固相上でのリガンドとターゲット分子との相互作用を解析する過程、ターゲット分子を選別する過程、あるいはターゲット分子をスクリーニングする為に実施されるリガンドとターゲット分子との結合反応（特異的な相互作用に基づいた反応）が行われる環境下であって、親水性スペーサーが電荷的に陽性あるいは陰性になるような官能基を有する場合にはイオン化するような条件下である。かかる条件は、例えば水溶液中、pH 1～11、温度0～100°Cであり、好ましくはpH中性付近（pH 6～8）、約4°C～約40°C程度である。

例え、本発明の親水性スペーサーは、下記式（I a）～（I e）からなる群より選択されるいずれか1つの式で表される部分構造を少なくとも1つ有する化合物である。



（式（I a）中、

A₁は—O—または—NH—であり、A₂は単結合または低級アルキレン基であり、

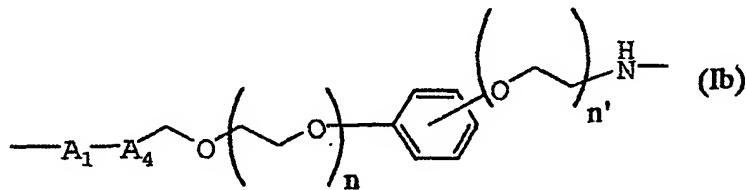
A₃は適当な連結基であり、

X₁～X₃はそれぞれ同一または異なって単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

$R_1 \sim R_7$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数 1 ~ 3 の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-CH_2OH$ あるいは水酸基であり、

m は 0 ~ 2 の整数であり、 m' は 0 ~ 10 の整数であり、 m'' は 0 ~ 2 の整数であり、

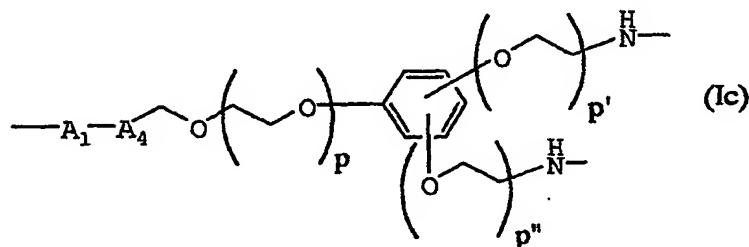
5 $R_3 \sim R_7$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよく、 X_3 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよい)；



(式 (Ib) 中、

A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、 A_4 は低級アルキレン基であり、

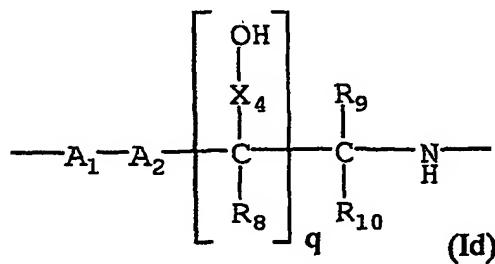
10 n および n' はそれぞれ同一または異なって 1 ~ 10 の整数である)；



(式 (Ic) 中、

A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、 A_4 は低級アルキレン基であり、

p 、 p' および p'' はそれぞれ同一または異なって 1 ~ 10 の整数である)；



15

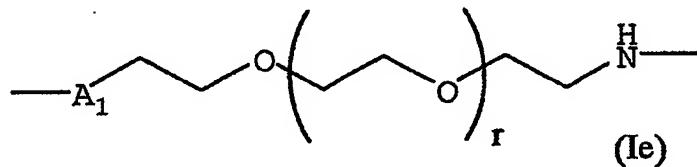
(式 (Id) 中、

A_1 は—O—または—NH—であり、 A_2 は単結合または低級アルキレン基であり、 X_4 は単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されてもよいメチレン基であり、

$R_8 \sim R_{10}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、—CH₂OHあるいは水酸基であり、

5 q は1～7の整数であり、

R_8 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよく、 X_4 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよい)；



10 (式(Ie)中、

A_1 は—O—または—NH—であり、

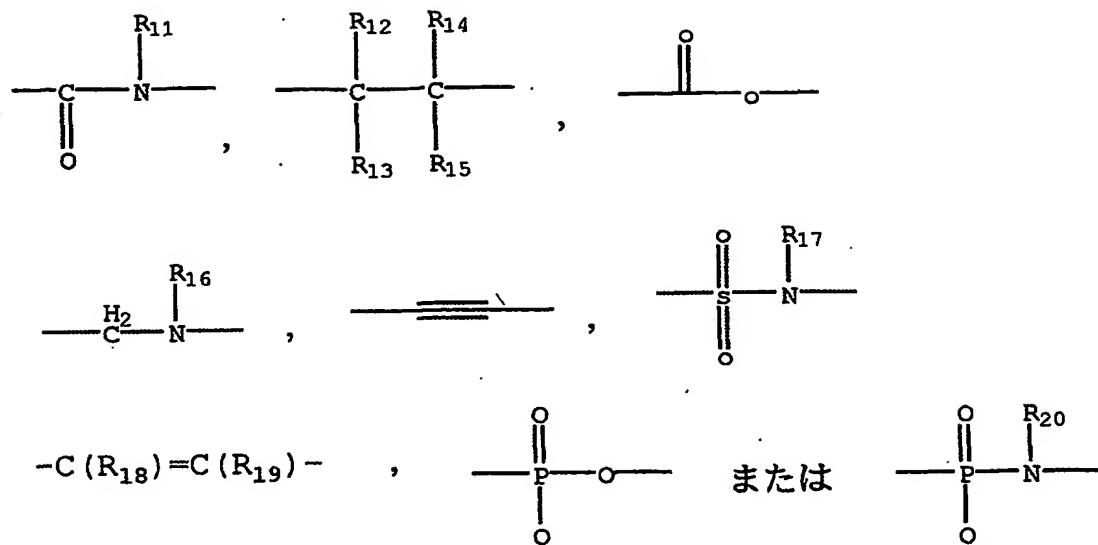
r は1～10の整数である)。

本明細書において各基の定義中「低級アルキレン基」とは、炭素数1～6の直鎖または分枝状のアルキレン基を意味し、具体的にはメチレン基、エチレン基、プロピレン基、イソプロピレン基、ブチレン基、イソブチレン基、sec-ブチレン基、tert-ブチレン基、ペンチレン基、イソペンチレン基、ネオペンチレン基、tert-ペンチレン基、ヘキシレン基、イソヘキシレン基等が挙げられる。

「炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基」としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基等が挙げられる。

20 本明細書において、「炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されてもよいメチレン基」とは無置換のメチレン基ならびに上記した炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で1または2置換されたメチレン基を意味する。

「適当な連結基」とは隣接する各々の部位を連結することができる基であれば特に限定されないが、具体的には以下の基が用いられる。



(式中、 R_{11} は水素原子または炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基であり、 $R_{12} \sim R_{15}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-CH_2OH$ あるいは水酸基であり、 $R_{16} \sim R_{20}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基（該アルキル基は水酸基、カルボン酸基、アミノ基等の親水性置換基で置換されていてもよい）である)

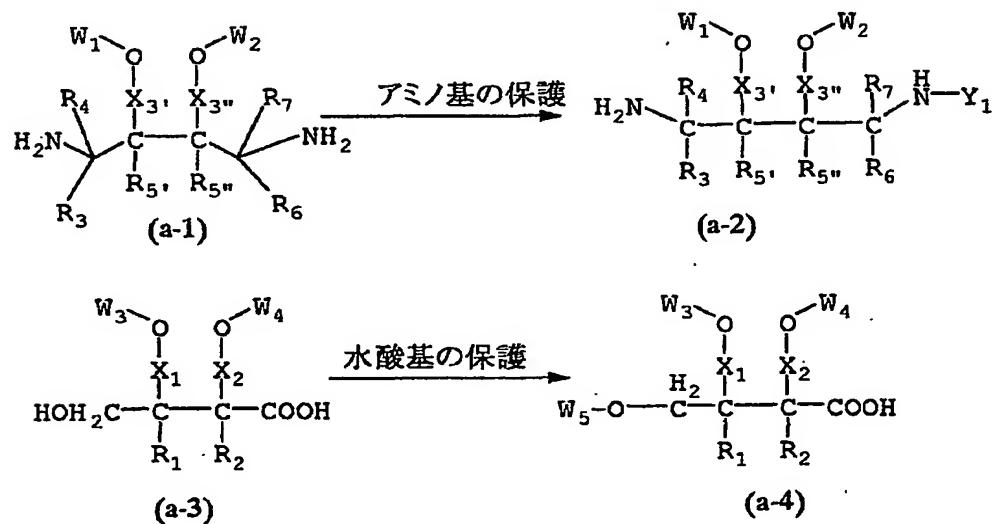
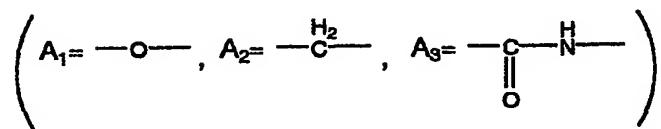
以下に本発明においてモノマーに組み込み得る親水性スペーサーの一般的製法について記載するが、記載される以外の通常当分野で実施される方法、あるいはそれらの方法を組み合わせた方法によっても又製造し得ることは当業者には明らかである。

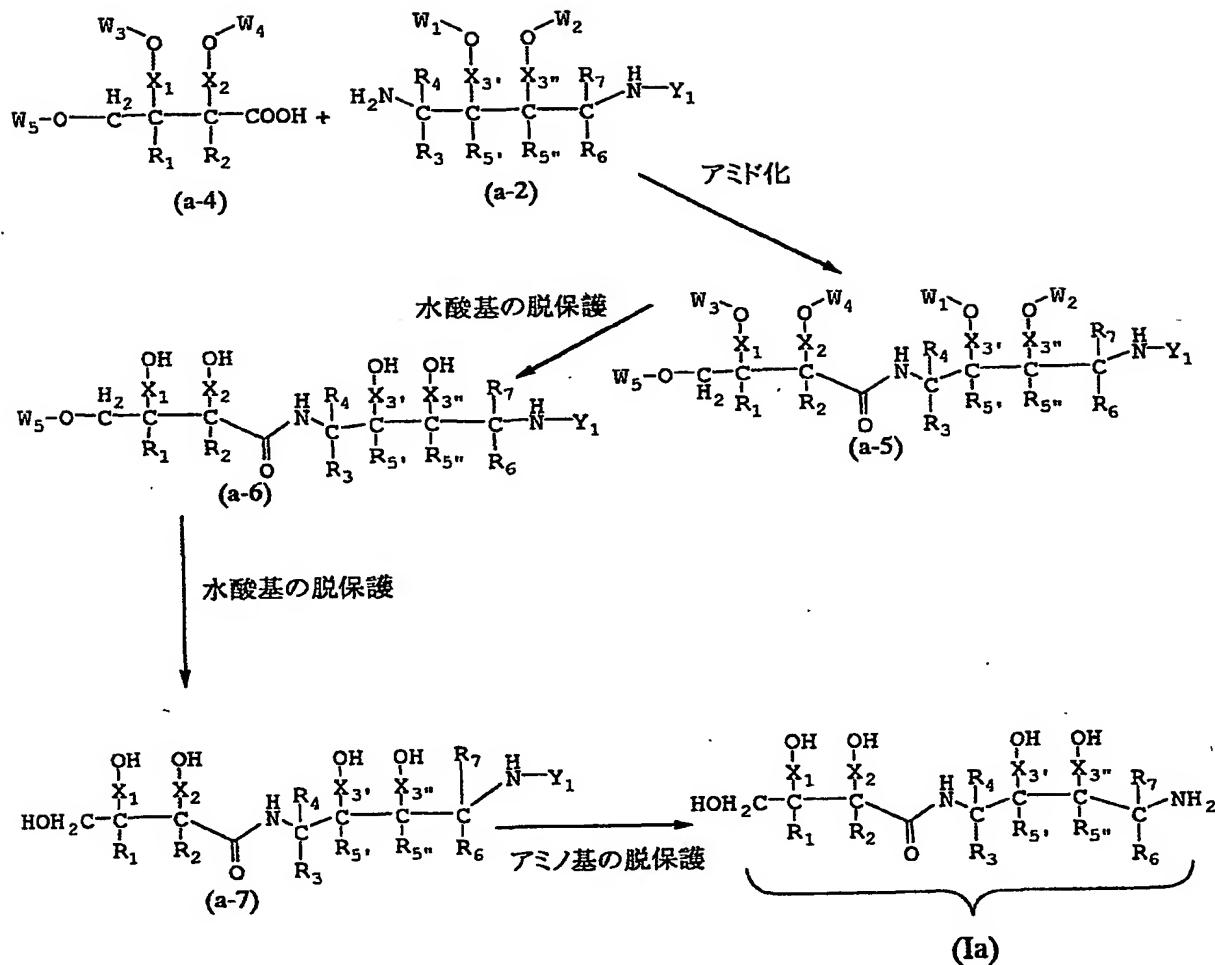
尚、本明細書で使用する略語は下記の通りである。

略語	正式名称
A c	アセチル基
AET	アミノエチルタータリックジアミド
A I B N	アソビスイソブチロニトリル
AMT	アミノメチルタータリックジアミド
B o c	tert-ブトキシカルボニル
B o c ₂ O	ジ-tert-ブチルジカルボネート
Bn	ベンジル基
Bu ₃ P	トリブチルfosfin
CDI	1, 1'-カルボニルジイミダゾール
DAB T	ジハイドロキシアミノブチルタータリックアシッド
DBU	1, 8-ジアザビシクロ[5. 4. 0]ウンデカ-7-エン
DMAP	ジメチルアミノビリジン
DME	1, 2-ジメトキシエタン
DMF	ジメチルホルムアミド
EDC	1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド
Et	エチル基
Fmoc	9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基
Fmoc-OSu	9-フルオレニルメチルスクシンイミジルカルボネート
HOBt	1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
HyT	ヒドラジノタータリックアミド
Me	メチル基
NMP	N-メチル-2-ピロリドン
PEG	ポリエチレングリコール
Ph ₃ P	トリフェニルfosfin
PyBOP	ベンゾトリアゾール-1-イルオキシートリス-ビロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート
TBAF	フッ化テトラブチルアンモニウム
TBDMS	tert-ブチルジメチルシリル基
TBDMSOTf	トリフルオロメタンスルホン酸 tert-ブチルジメチルシリル基
TBDPS	tert-ブチルジフェニルシリル基
TBS	tert-ブチルジメチルシリル基
tBu	tert-ブチル基
TFA	トリフルオロ酢酸
THF	テトラヒドロフラン
TMAD	N, N, N', N'-テトラメチルアゾジカルボキサミド
TOYO-	
Pearl	
resin	TOYOパール樹脂
Tr	トリチル基
Ts	トシリル基 (トルエンスルホニル基)
WSC	水溶性カルボジイミド (N-エチル-N'-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)

製法1：一般式 (I a) で表される部分構造を有する親水性スペーサーの製造方法

(1) ($m = 1$, $m' = 2$, $m'' = 1$)





式中、 $\text{W}_1 \sim \text{W}_5$ は水酸基の保護基であり、 Y_1 はアミノ基の保護基である。 X_3' は X_3 と同義であり、また $\text{X}_{3''}$ も X_3 と同義である。 $\text{R}_{5'}$ は R_5 と同義であり、また $\text{R}_{5''}$ も R_5 と同義である。またそれ以外の各記号の定義は上述の通りである。

5 水酸基の保護基としては、当分野で通常用いられている任意の各基が用いられるが、具体的には、tert-ブチル基等のアルキル基；アセチル基、プロピオニル基、ピバロイル基、ベンゾイル基等のアシル基；メトキシカルボニル基、tert-ブチカルボニル基等のアルコキシカルボニル基；ベンジルオキシカルボニル基等のアラルキルオキシカルボニル基；ベンジル基、ナフチルメチル基等のアリールメチル基；トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、tert-ブチルジメチ

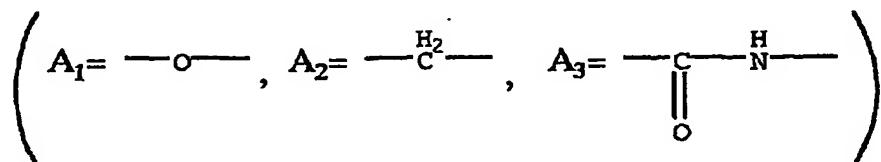
10

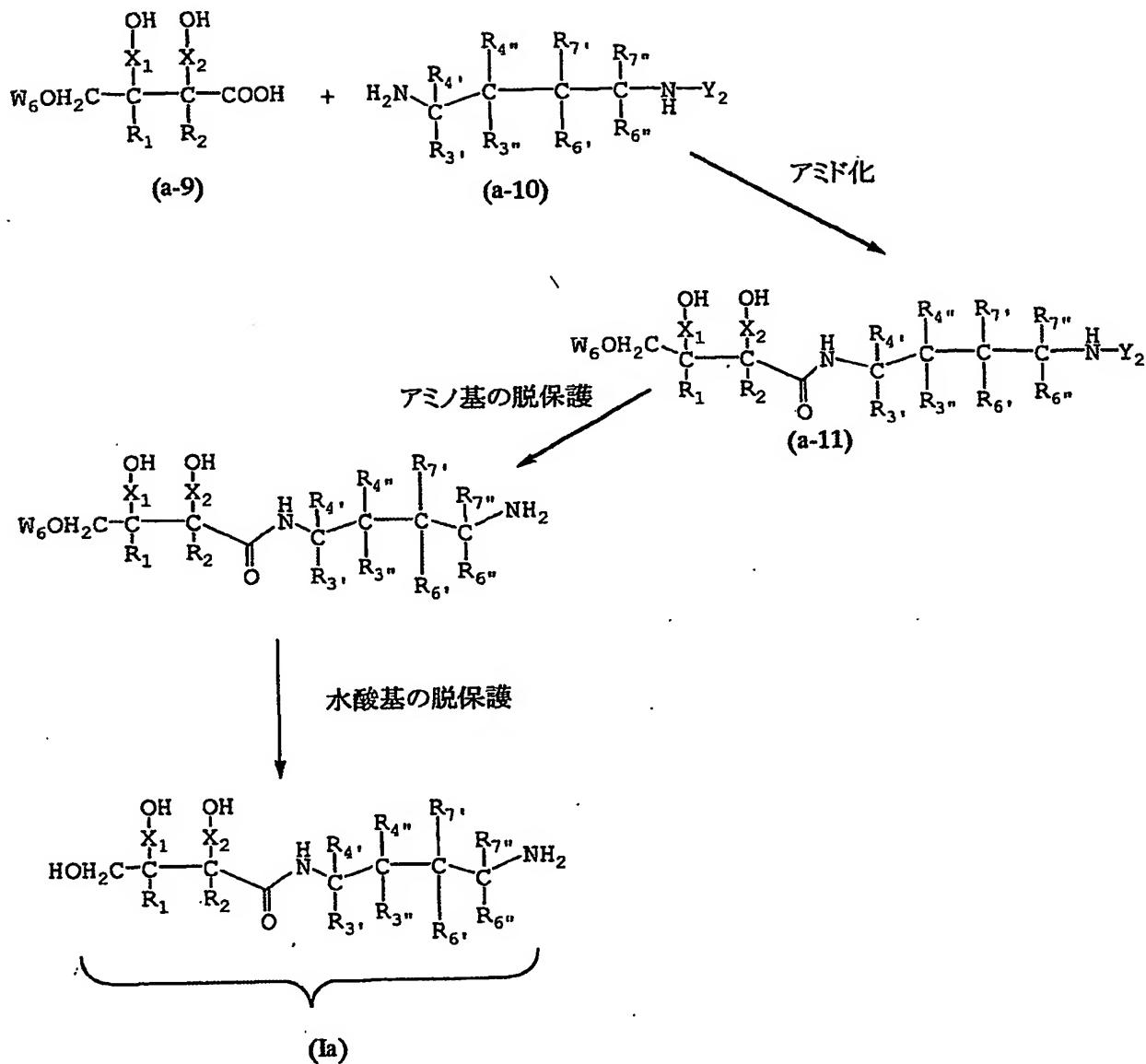
ルシリル基、*tert*-ブチルジフェニルシリル基等のシリル基；エトキシメチル基、メトキシメチル基等の低級アルコキシメチル基などが例示され、好ましくは、*tert*-ブチルジメチルシリル基、*tert*-ブチルジフェニルシリル基、メトキシメチル基、*tert*-ブチル基が挙げられる。アミノ基の保護基としては、当5分野で通常用いられている任意の各基が用いられるが、具体的には、*tert*-ブトキシカルボニル基、メトキシカルボニル基等の低級アルコキシカルボニル基；ベンジルオキシカルボニル基等のアラルキルオキシカルボニル基；ベンジル基等のアラルキル基；ベンゼンスルホニル基、*p*-トルエンスルホニル基、メタスルホニル基等の置換スルホニル基などが例示され、好ましくは、*tert*-ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基が挙げられる。
10

アミノ基の保護および脱保護、ならびに水酸基の保護および脱保護は使用する保護基に応じて適宜公知の方法および試薬によって実施される。

化合物(a-4)(カルボン酸)および化合物(a-2)(アミノ体)をアミド化によって脱水縮合する反応は、通常、等量のアミノ体とカルボン酸の存在下、1.15当量程度のN-エチル-N'-ジメチルアミノカルボジイミド、N-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール等の縮合剤を用いて、DMFや塩化メチレン等の溶媒中で、室温下1時間から10時間程度反応させることによって行われる。

製法2：一般式(I.a)で表される部分構造を有する親水性スペーサーの製造方法
(2) (m=2, m'=0, m''=2)





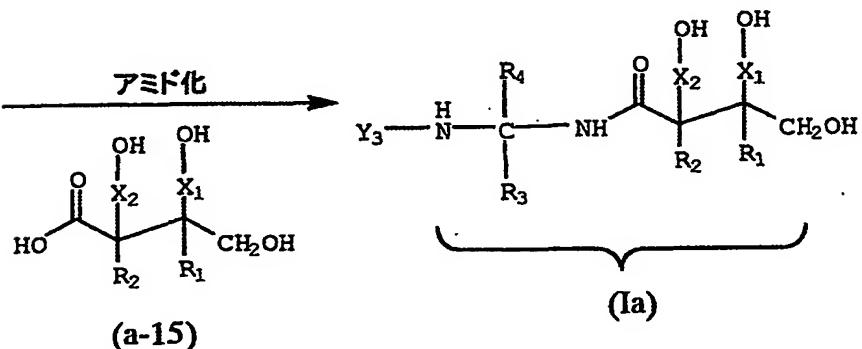
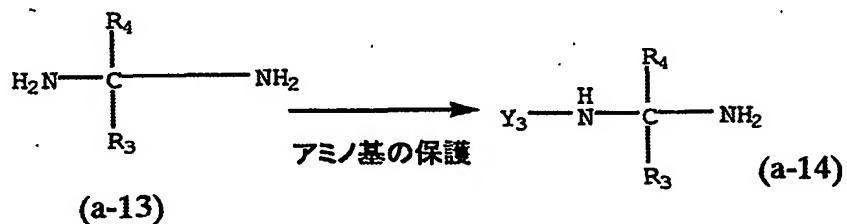
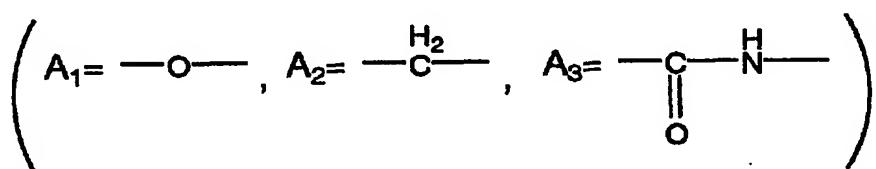
式中、 Y_2 はアミノ基の保護基である。 W_6 は水酸基の保護基である。 R_3' は R_3 と同義であり、また R_3'' も R_3 と同義である。 R_4' は R_4 と同義であり、また R_4'' も R_4 と同義である。 R_6' は R_6 と同義であり、また R_6'' も R_6 と同義である。 R_7' は R_7 と同義であり、また R_7'' も R_7 と同義である。それ以外の各記号の定義は上述の通りである。アミノ基の保護基としては、上記したものと同様のものが例示される。アミノ基の脱保護は使用する保護基によって適宜公知の方法および試薬によつ

て実施される。

化合物 (a-9) (カルボン酸) および化合物 (a-10) (アミノ体) をアミド化によって脱水縮合する反応は、通常、等量のアミノ体とカルボン酸の存在下、1. 1当量程度のN-エチル-N'-ジメチルアミノカルボジイミド、およびN-ヒドロキシベンゾトリアゾール等の縮合剤を用いて、DMFや塩化メチレン等の溶媒中で、室温下1時間から10時間程度反応させることによって行われる。

製法3：一般式 (Ia) で表される部分構造を有する親水性スペーサーの製造方法

(3) ($m=1$, $m'=0$, $m''=0$)



10

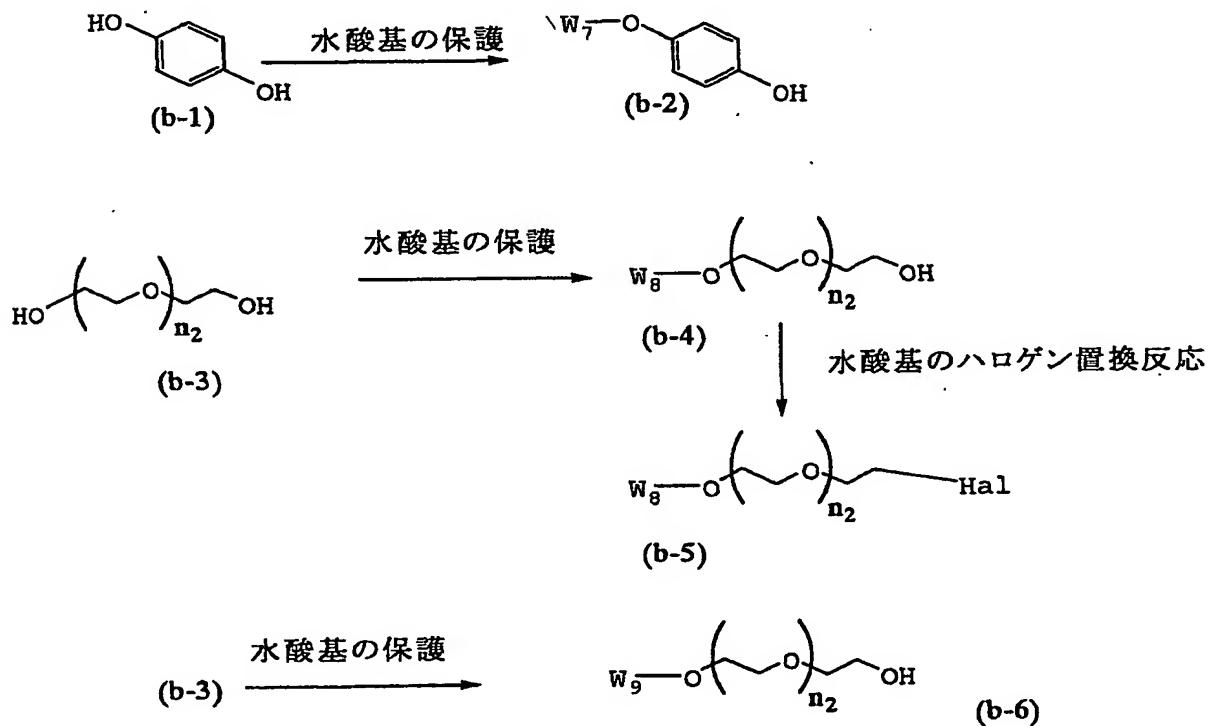
式中、 Y_3 はアミノ基の保護基であり、それ以外の各記号の定義は上述の通りである。アミノ基の保護基としては、上記したものと同様のものが例示される。

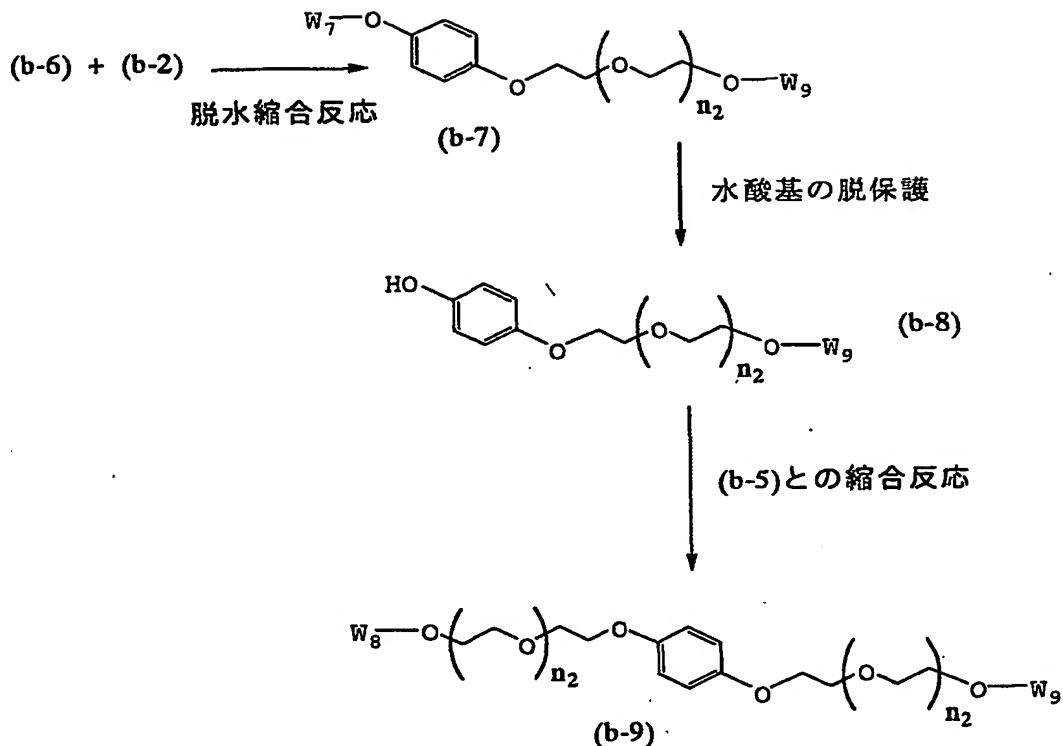
化合物 (a-14) (アミノ体) および化合物 (a-15) (カルボン酸) をアミド化によって脱水縮合する反応は、通常、等量のアミノ体とカルボン酸の存在下、

1. 1当量程度のN-エチル-N'-ジメチルアミノカルボジイミド、およびN-ヒドロキシベンゾトリアゾール等の縮合剤を用いて、DMFや塩化メチレン等の溶媒中で、室温下1時間から10時間程度反応させることによって行われる。

製法4：一般式(Ib)で表される部分構造を有する親水性スペーサーの製造方法

5 (n-1=n'-1=n₂)





式中、 $\text{W}_7 \sim \text{W}_9$ は水酸基の保護基であり、 H a 1 はハロゲン原子（塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、フッ素原子）を表し、それ以外の各記号の定義は上述の通りである。水酸基の保護基としては、上記したものと同様のものが例示される。尚 n_2 は、 $n - 1$ あるいは $n' - 1$ である (n, n' は上述のとおり)。

5

水酸基の保護、脱保護は使用する保護基によって適宜公知の方法および試薬によって実施される。

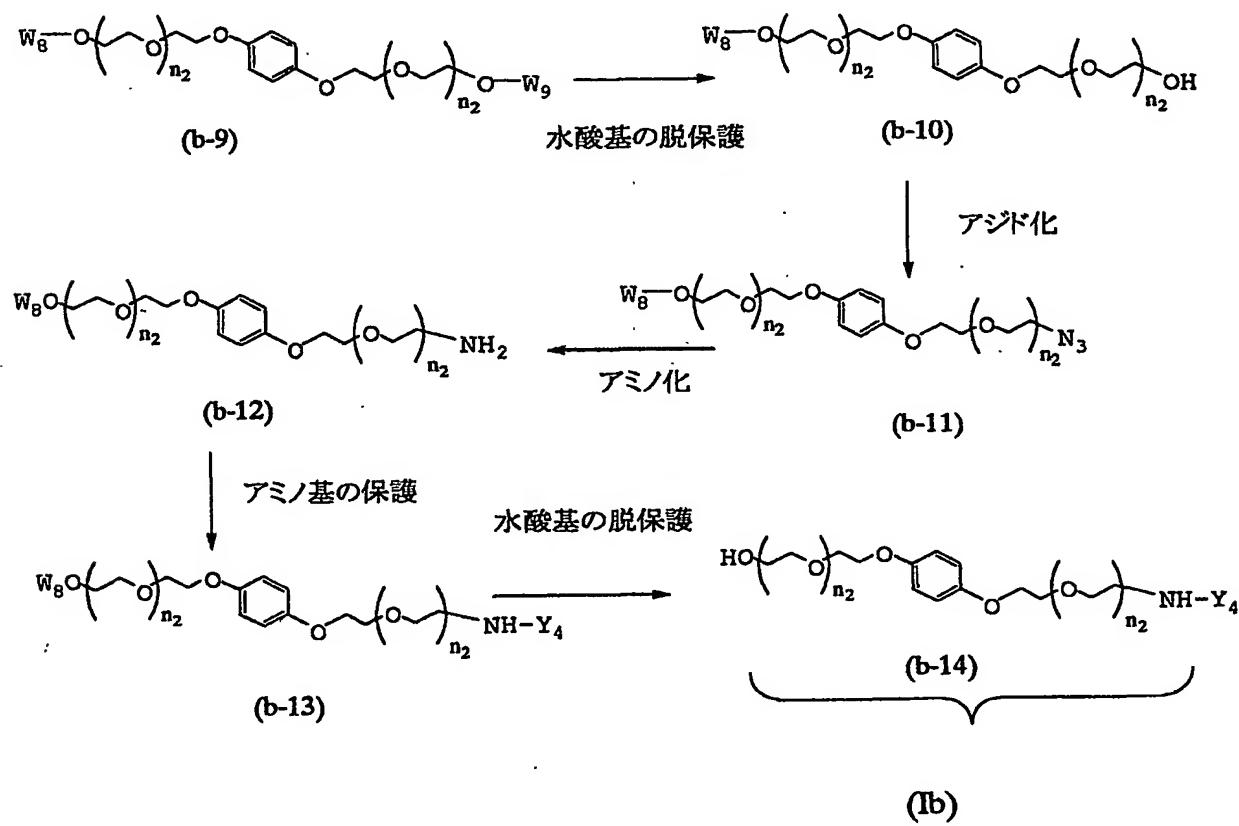
10

化合物 (b-4) (アルコール体) の化合物 (b-5) へのハロゲン置換反応は、通常、1当量のアルコール体に2~3当量の四臭化炭素、および1~2当量のトリフェニルホスフィンを塩化メチレン等の溶媒中で、0°C~室温で、1時間から数時間反応させることによって行われる。

化合物 (b-6) (アルコール体) と化合物 (b-2) (フェノール体) との脱水縮合反応は、通常、1当量のアルコール体と1当量のトリプチルホスフィンをトルエン溶媒中室温で1時間程度反応を行い、ここに1当量のフェノール体および1,

1' -アゾビス (N, N-ジメチルホルムアミド) 等の縮合剤を加え、0～50°Cで数時間から終夜で反応させることによって行われる。

化合物 (b-8) (フェノール体) と化合物 (b-5) (ハロゲン体) との縮合反応は、通常、0～10°Cにおいて、1当量のフェノール体と約10倍当量の過剰の水素化ナトリウムのような強塩基をTHF等の溶媒中で、10～60分程度反応させ、そこに2当量程度のハロゲン体を加え、室温下1～10時間程度反応させることによって行われる。



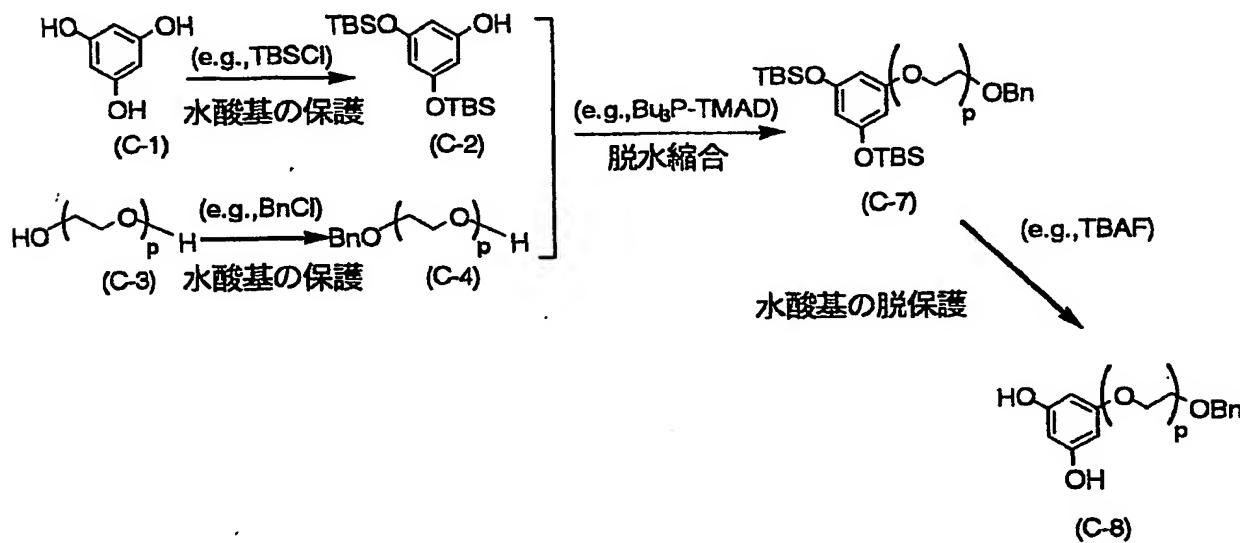
式中、 Y_4 はアミノ基の保護基であり、それ以外の各記号の定義は上述の通りである。水酸基の保護基およびアミノ基の保護基としては、上記したものと同様のものが例示される。

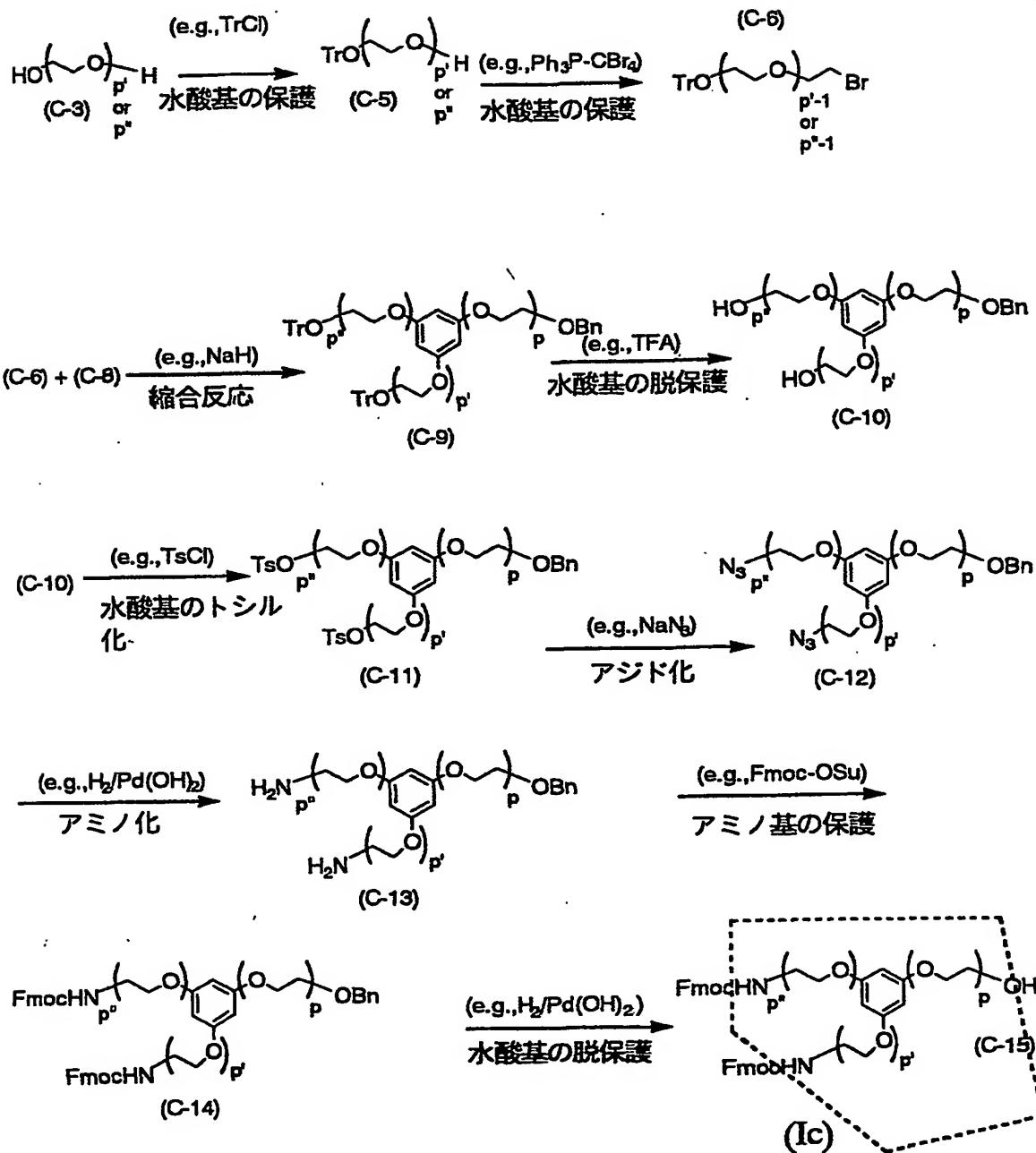
水酸基あるいはアミノ基の脱保護は使用する保護基によって適宜公知の方法および試薬によって実施される。

化合物 (b-10) (アルコール体) の化合物 (b-11) へのアジド化は、通常、1 当量のアルコール体と 1.5 当量程度の p-トルエンスルホニルクロライドおよび 0.2 当量程度の 4-ジメチルアミノピリジンのような塩基をピリジン等の溶媒中で、30~50°C で、数時間反応させることによって得られる O-トシリル体を単離し、それに約 10 倍当量程度の過剰のアジ化ナトリウムを加え、DMF 等の溶媒中で、50~90°C で数時間反応させることにより行われる。

化合物 (b-11) (アジド体) の化合物 (b-12) へのアミノ化は、通常、1 当量のアジド体を、0.1 当量程度の水酸化パラジウムのような触媒を用いてメタノール等の溶媒存在下、1~数気圧の水素存在下、室温で数時間反応させることによって得られる。

製法 5：一般式 (Ic) で表される部分構造を有する親水性スペーサーの製造方法
各構造式中、特定の基、特定の化合物を記載する場合があるが、それらは一例であって、特に限定されるものではない。同等の働きを有するものであれば適宜変更し得る。





式中、各記号の定義は上述の通りである。式中の水酸基の保護基、アミノ基の保護基、カルボキシル基の保護基はその一例を示したものであって、それ以外にも通常分野で用いられる任意の各基が用いられる。具体的には上記したものと同様なものが例示される。アミノ基の保護、カルボキシル基の脱保護、および水酸基の保

護ならびに脱保護の方法は、本明細書に記載する以外にも、使用する保護基に応じて適宜公知の方法および試薬によって実施され得ることは当業者には明らかである。

化合物(c-1)(フェノール体)の化合物(c-2)への水酸基の保護は、例え
5 ば保護基としてTBSを使用する場合には、通常、1当量のフェノール体、3当量
程度の塩基(例えばイミダゾール)および2当量程度のシリルクロライドを、DM
F等の溶媒中で、室温で10時間程度反応させることによって行われる。

化合物(c-2)(フェノール体)と化合物(c-4)(アルコール体)との脱水
10 縮合反応は、通常、1当量のアルコール体と1当量のトリプチルホスフィンとをト
ルエン溶媒中室温で1時間程度反応を行い、ここに1. 3当量のフェノール体およ
び1. 3当量の1, 1' -アズビス(N, N-ジメチルホルムアミド)等の縮合剤
を加え、室温で数時間から終夜反応させることによって行われる。

化合物(c-7)(フェノール保護体)の化合物(c-8)への水酸基の脱保護は、
15 通常、1当量のフェノールの保護体(例えばシリル保護体)、1. 2当量程度のテトラ
ブチルアンモニウムフルオライドをTHF等の溶媒中で、室温で1時間程度反応
させることによって行う。

化合物(c-8)(フェノール体)と化合物(c-6)(ハロゲン化物)との縮合
20 反応は、通常、室温で1当量のフェノール体と約5. 2当量の過剰の水素化ナトリウム
のような強塩基をTHFやDMF等の溶媒中で、10~60分程度反応させ、
そこに4当量程度のハロゲン化物(例えばアルキルプロマイド)を加え、室温で約
4時間程度反応させることによって行われる。この縮合反応によって化合物(c-9)
が得られる。

化合物(c-9)(フェノール保護体)の化合物(c-10)(アルコール体)への水酸基の脱保護は、通常、1当量のフェノール保護体(例えばトリチル保護体)
25 を、TFAを含む塩化メチレン等の溶媒中で、室温で約1時間程度反応させること
によって行われる。

化合物(c-10)(アルコール体)の化合物(c-11)への水酸基のトシリ化

反応は、例えば保護基としてT-sを使用する場合には、通常、1当量のアルコール体、触媒量のDMP等の塩基、約6当量のトシリクロライドを、ピリジン等の溶媒中で、室温～40°Cで約2時間程度反応させることによって行われる。

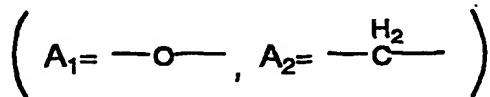
化合物(c-11)(トシリル体)の化合物(c-12)へのアジド化は、1当量のトシリル体、約1.5当量のアジ化ナトリウムを、DMF等の溶媒中で、約60°C、約2時間程度反応させることによって行われる。

化合物(c-12)(フェノール保護体)の化合物(c-13)へのアミノ化および、化合物(c-14)へのアミノ基の保護基の導入は、通常、1当量のフェノール保護体(ベンジル保護体)、触媒量の水酸化パラジウムを水素ガス雰囲気下、メタノール等の溶媒中で、室温で約1時間程度反応させることによって得られるアミン体(c-13)に、約0.84当量の炭酸9-フルオレニルメチルスクシンイミジル、約1.5当量のトリエチルアミンのような塩基を加え、THF等の溶媒中で、室温で約1時間程度反応させることによって行われる。

化合物(c-14)(水酸基保護体)の化合物(c-15)への水酸基の脱保護は、通常、1当量の水酸基保護体(例えばベンジル保護体)を0.1当量程度の水酸化パラジウムのような触媒を用いてメタノール等の溶媒存在下、1～数気圧の水素存在下、室温で数時間反応させることによって得られる。

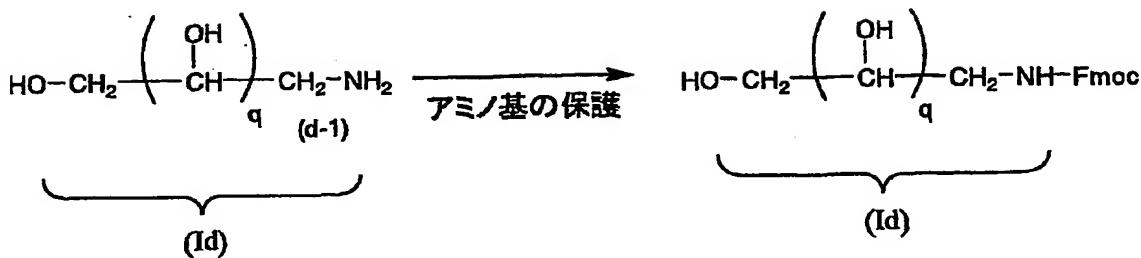
製法6：一般式(I,d)で表される部分構造を有する親水性スペーサーの製造方法

(R₁₀=R₉=水素原子、R₈=水素原子、X₄=単結合)



20

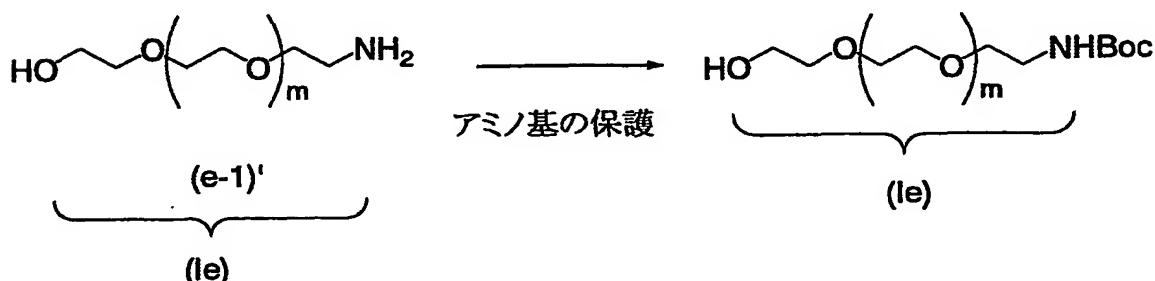
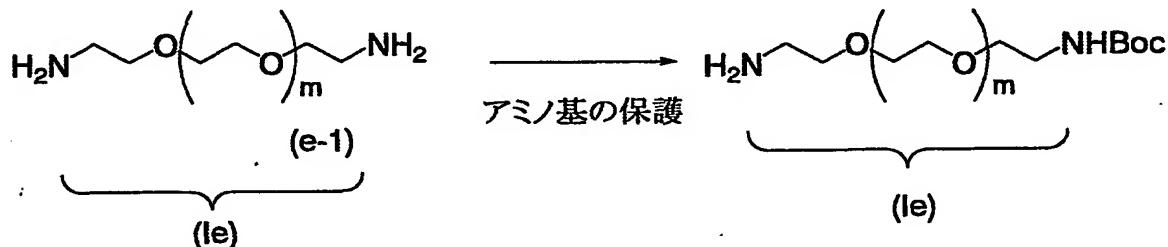
各構造式中、特定の基、特定の化合物を記載する場合があるが、それらは一例であって、特に限定されるものではない。同等の働きを有するものであれば適宜変更し得る。尚、下記式(d-1)は商業的に入手可能である。



式中、各記号の定義は上述の通りである。式中のアミノ基の保護基はその一例を示したものであって、それ以外にも通常当分野で用いられる任意の各基が用いられる。具体的には上記したものと同様なものが例示される。アミノ基の保護の方法は、
5 使用する保護基に応じて適宜公知の方法および試薬によって実施され得る。

製法 7：一般式 (I e) で表される部分構造を有する親水性スペーサーの製造方法

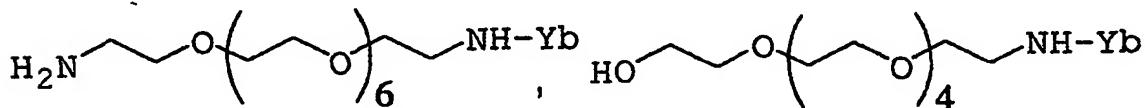
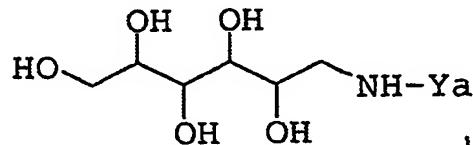
各構造式中、特定の基、特定の化合物を記載する場合があるが、それらは一例であって、特に限定されるものではない。同等の働きを有するものであれば適宜変更し得る。尚、下記式 (e-1) および (e-1)' は商業的に入手可能である。



式中、各記号の定義は上述の通りである。式中のアミノ基の保護基はその一例を

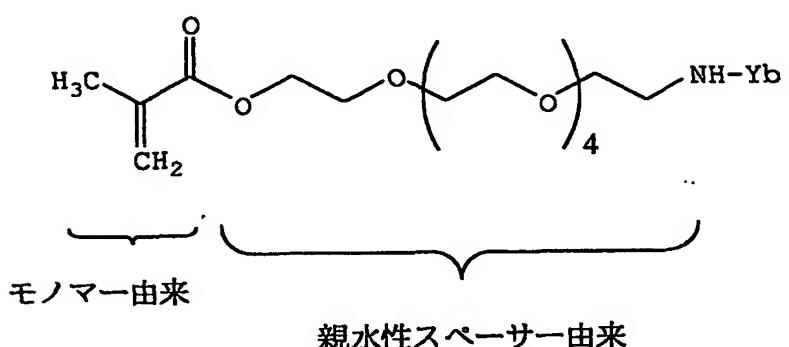
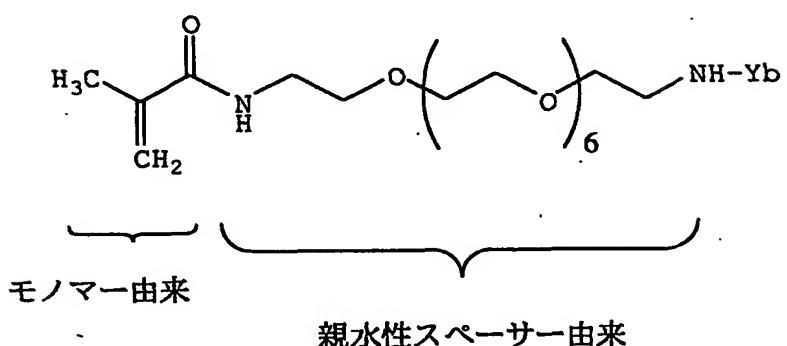
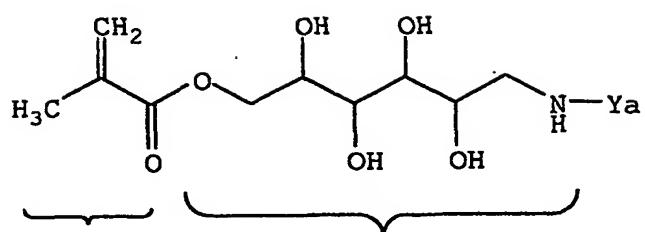
示したものであって、それ以外にも通常当分野で用いられる任意の各基が用いられる。具体的には上記したものと同様なものが例示される。アミノ基の保護の方法は、使用する保護基に応じて適宜公知の方法および試薬によって実施され得る。

本発明の樹脂を製造するにあたり使用される親水性スペーサーとして好ましくは、
5 式 (I d) または式 (I e) で表される部分構造を少なくとも 1 つ有するものであ
って、特に式 (I d) においては、A₁が-O-であり、A₂が低級アルキレン基 (特
にメチレン基) であり、複数個存在するX₄が同一で単結合であり、qが4であり、
複数個存在するR₈が同一で水素原子であり、R₉およびR₁₀が水素原子である親水
性スペーサーが好適である。より具体的には下記式



10 (式中、Y_aおよびY_bは水素原子またはアミノ保護基である) で表される化合物
を上記したモノマー (好ましくは (メタ) アクリル系モノマー) に組み込んでなる
親水性モノマーの重合体を含む樹脂が本発明において好適に使用される。

15 親水性スペーサーを組み込んだモノマー (すなわち親水性モノマー) としては、
例えれば以下のような化合物が例示される。



(式中 Y a および Y b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

本発明の樹脂は本発明の親水性モノマーを重合することによって得られる、重合方法としては、例えば、溶液重合、エマルジョン重合、分散重合、懸濁重合、固相重合（高分子学会編、「高分子科学実験法」東京化学同人、ISBN 4-8079-0180）などが挙げられる。これらの重合方法においては、通常知られる添加剤を用いてもよい。例えば、重合開始剤として、過酸化ベンゾイルおよび *tert*

一ブチルヒドロペルオキシド等の有機過酸化物、ならびにアゾビスイソブチロニトリル等のアゾ化合物などが挙げられる。エマルジョン重合の場合は、さらに界面活性剤が必要となり、例えば、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン誘導体、ポリオキシエチレンアルキルアミン、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル等）、陰イオン界面活性剤（例えば、脂肪酸塩、アルキルリン酸塩、アルキル硫酸エステル塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキルナフタレンスルホン酸塩、アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸塩等）等が挙げられ、これらを併用しても良い。懸濁重合の場合にはさらに分散安定剤を添加してもよいが、分散安定剤の例としてはポリビニルアルコールおよびポリアクリル酸塩のような水溶性高分子化合物が挙げられる。又、必要に応じてグリセロールジメタクリレート（C A S = [1 8 3 0 - 7 8 - 0]）、トリエチレングリコールジメタクリレート（C A S = [1 0 9 - 1 7 - 1]）やパラジビニルベンゼン（C A S = [1 3 2 1 - 7 4 - 0]）等の架橋剤を添加する。

懸濁重合や分散重合等、通常有機相と水相等の多相状態で重合を行う場合、使用する親水性モノマーの種類、特にあらかじめ導入している親水スペーサーの種類に応じて有機溶媒を適宜検討・選択する必要があるが、以下の要件を満たす有機溶媒を用いることが好ましい。

- ・水不溶性である。
- ・親水性モノマーを溶かし得る。
- ・沸点が70°C以上である。

重合反応に付す各成分として親水性モノマーの他に、例えば重合開始剤および架橋剤を用いる場合には、その割合は、親水性モノマー100重量部に対して、重合開始剤を通常0.1%～10%重量部、好ましくは1%～3%重量部、架橋剤を通常1%～20%重量部、好ましくは1%～5%重量部混ぜる。また20%以上の架橋剤の添加も好ましく、通常90%程度迄の架橋剤を添加し得る。重合反応の諸条件は、利用する重合反応の種類等によっても異なるが、いずれも当分野で公知であ

り、例えば窒素ガス等の不活性ガスでページした後、上記各成分の混合物を、温度を70～100℃に加熱して、通常3～10時間かけて実施する(高分子学会編、「高分子科学実験法」東京化学同人、ISBN 4-8079-0180)。

5 親水性モノマー、重合開始剤および架橋剤に加え、必要に応じて、着色剤、紫外線吸収剤、熱安定剤、重合禁止剤、帶電防止剤、充てん剤等の添加剤を添加することができる。

又、親水性モノマーの重合により得られる樹脂について、その表面の過剰な遊離アミノ基により生じる過剰なリガンド結合が結果的に樹脂の物性を変えてしまうような場合、リガンドとの結合性を低減させるために、遊離のアミノ基に対してアセチルキャッピング等の処理を施してもよい。

10 本発明の樹脂は、親水性モノマーの重合体のみで構成されるものであってもよいが、上記した通り、過剰なリガンド結合を防ぐ目的で、遊離アミノ基を有さないモノマーを一定量混合させて得られるモノマー混合物の重合体であってもよい。そのようなモノマーとしては、当分野で通常使用されている樹脂原料となる種々のモノマー化合物が挙げられる。好ましくは、化学的安定性ならびに物理的安定性に優れた樹脂を合成し得る(メタ)アクリル系のモノマーである。(メタ)アクリル系のモノマーの例としては、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、プロピル(メタ)アクリレート、ブチル(メタ)アクリレート、2-エチルヘキシル(メタ)アクリレート、ラウリル(メタ)アクリレート、ステアリル(メタ)アクリレート、シクロヘキシル(メタ)アクリレート、2-ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、2-プロピル(メタ)アクリレート、クロロー-2-ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、ジエチレングリコールモノ(メタ)アクリレート、メキシエチル(メタ)アクリレート、グリシジル(メタ)アクリレート、ジシクロペニタニル(メタ)アクリレート、ジシクロペンテニル(メタ)アクリレートおよびイソボルニル(メタ)アクリレート等を挙げることができる。

20 さらに親水性モノマーについても同じ種類の親水性モノマー(すなわち導入されている親水性スペーサーが同じ)であってもよいし、異なる種類の複数の親水性モ

ノマーの混合物（すなわち導入された親水スペーサーが異なるモノマーの混合物）であってもよい。

本発明の樹脂は、親水性スペーサーの導入により、樹脂表面（以下固相表面ともいう）の疎水性の程度が低減化されている。従って、タンパク質等の当該樹脂への非特異的な吸着が極めて抑制されている。このような効果は、本発明の樹脂を、分子間の特異的相互作用の解析やリガンドのターゲット分子の同定等への利用に好適なものとしている。すなわち、本発明の樹脂はアフィニティークロマトグラフィー用の担体として有用である。アフィニティークロマトグラフィーにおいては、本発明の樹脂、すなわち本発明の担体にそのターゲット分子を同定することを所望とする、あるいはそのターゲット分子との特異的相互作用を解析することを所望とする分子（以下、リガンドともいう）を固定化する。尚、本明細書中、リガンドならびにターゲット分子という用語は、互いに特異的な分子間相互作用を有する組み合わせを意図するものであって、当該組み合わせのうち、片方をリガンドとして固相に固定化すれば他方がターゲット分子となり、すなわちどちらを固相に固定化するかによって、それらの呼称は変更され得る。

「特異的な相互作用」とは、特定のリガンド（特定のターゲット分子）のみを特異的に認識して結合するような特性を発揮する作用であり、アゴニストあるいはアンタゴニストに対する特異的受容体、基質に対する酵素、そして例えばFK506（リガンド）に対するFK506結合タンパク質（ターゲット分子）や、ステロイドホルモンに対するステロイドホルモン受容体（例=dexamathasonとglucocorticoid receptor）、抗癌剤trapoxinに対するHDAC等の関係が「特異的な相互作用」に該当する。一方、「非特異的な相互作用」とは、それによる結合の対象が広範にわたり且つ特定分子に限定されず、反応条件によって種々変化するような状況を生じる作用をいい、本発明においては、担体上のリガンドや担体表面に、結合・吸着するような不特定の分子との間の作用を意味する。「非特異的な相互作用」は、「特異的な相互作用」に基づくりガンドとターゲット分子の結合の障害となるか、あるいは混同されることにより「特異的な

相互作用」による結合を見落としてしまう危険性がある。

本発明において「特異的な相互作用を解析する」とは、リガンドとターゲット分子との間の相互作用の特異性の程度を、相互作用情報として得ることであって、例えば K_d 、 K_a 等の数値として得ることができる。本発明において「選別」とは、上記相互作用情報に基づき、リガンドと特異的な相互作用を有するか否かを判定し、ターゲット分子を同定することを意味する。

リガンドの樹脂への固定化は、リガンドと樹脂表面に存在する親水性スペーサーとの結合による。固定化するリガンドによっては、あらかじめ親水性スペーサーとの結合を容易にするためのリンカーを導入しておくこともまた好適である。リガンドが担体に固定化されたか否かは、リガンド、あるいはリガンドに予め結合・導入された任意の基に含まれるある特定の構造乃至置換基等に基づく呈色反応等を利用して確認することができる。例えばアミノ基を認識するニンヒドリン反応等が利用できる。結合は、通常当分野で実施される反応を利用して実施される。簡便且つ確実な手段としてアミド結合形成反応を利用する方法が挙げられる。本反応は、例えば「ペプチド合成の基礎と実験」(ISBN 4-621-02962-2、丸善、昭和60年初版)に従って実施できる。各反応に用いられる試薬や溶媒については当分野で通常用いられるものが利用でき、採用する結合反応によって適宜選択される。

本発明において樹脂表面に固定化されるリガンドは特に限定されず、公知の化合物であっても今後開発される新規な化合物であってもよい。また、低分子化合物であっても高分子化合物であってもかまわない。ここで低分子化合物とは分子量1000未満程度の化合物であって、例えば医薬品として通常使用し得る有機化合物およびその誘導体や無機化合物が挙げられ、有機合成法等を駆使して製造される化合物やその誘導体、天然由来の化合物やその誘導体、プロモーター等の小さな核酸分子や各種の金属等であり、望ましくは医薬品として使用し得る有機化合物およびその誘導体、核酸分子をいう。また、高分子化合物としては分子量1000以上程度の化合物であって、タンパク質、ポリ核酸類、多糖類、およびこれらを組み合わせ

たものなどが挙げられ、望ましくはタンパク質である。これらの低分子化合物あるいは高分子化合物は、公知のものであれば商業的に入手可能であるか、各報告文献に従って採取、製造、精製等の工程を経て得ることができる。これらは、天然由来であっても、また遺伝子工学的に調製されるものであってもよく、また半合成等によっても得ることができる。
5

本発明の樹脂は、アフィニティークロマトグラフィー用の固相担体としてリガンドを固定化した固相担体上で該リガンドとの特異的な相互作用に基づいてターゲット分子を選別する為に使用することが可能であり、また有用である（以下、当該アフィニティークロマトグラフィー用の固相担体を本発明の固相担体ともいう）。従つてターゲット分子は、リガンドと特異的に相互作用するものであれば特に限定されるものではなく、公知化合物である場合もあれば新規物質である場合も予想される。ターゲット分子としては低分子化合物であっても高分子化合物であってもかまわない。

10

リガンドとターゲット分子との相互作用の解析、ならびにターゲット分子の選別は簡便には本発明の固相担体上で行う。ターゲット分子として予め候補物質が予測される場合には、候補物質を単独で固相担体上のリガンドと接触させ両者の相互作用を測定し、候補物質が該リガンドのターゲット分子であるか否かを判断すればよいが、通常、複数の物質（高分子化合物および／または低分子化合物）を含む試料をリガンドと接触させ、複数の物質（高分子化合物および／または低分子化合物）の各々とリガンドとの相互作用の有無ならびにその相互作用の程度を測定することによりターゲット分子であるか否かを判断し、選別する。ここで複数の物質を含む試料としては、全て公知化合物から構成されるものであっても、一部新規な化合物を含むものであっても、さらには全て新規な化合物から構成されるものであってもよい。しかしながら、リガンドのターゲット分子の探索、あるいは昨今のプロテオーム解析の進歩によれば、全てその構造が公知な化合物の混合物であることが望ましい。全て公知な化合物から構成される試料としては、大腸菌等によって遺伝子工学的に調製された精製タンパク質の混合物等であり、一部新規な化合物を含むもの

15

20

25

としては、細胞や組織の抽出物 (Ly s a t e) であり、また全て新規な化合物から構成されるものとしては、まだその機能や構造が知られていない新規なタンパク質や新しく合成された化合物等の混合物が挙げられる。試料が混合物の場合、特に公知化合物を含む場合には、任意にこれらの化合物の試料中の含有量を所望の値に5 設定しておくこともできる。リガンドのターゲット分子の探索という見地にたてば、選別すべき分子は、低分子化合物ならびに高分子化合物であるのが好ましく、ヒト等の動物体内でのターゲット分子の探索についていえば高分子化合物であることが好ましい。

本発明の固相担体はまた、当該固相担体上に固定化されているリガンドに特異的な相互作用を有するターゲット分子をスクリーニングする為に使用することが可能10 であり、また有用である。該スクリーニング方法は具体的には以下の工程を少なくとも含む。

(1) 試料を、本発明の固相担体と接触させる工程。

本工程において用いる試料は、上記同様、複数の物質を含み得るものである。その態様は特に限定されず、固相担体との接触や後の工程 (2) で実施する同定あるいは解析にどのような原理や手段、方法を用いるかによって適宜変更し得る。例えば本発明の樹脂 (固相担体) を充填したカラムを用いる場合には試料は液状とするのが好ましい。該試料と本発明のリガンド固定化固相担体とを接触させる方法は、ターゲット分子が試料中に存在する場合にリガンド固定化固相担体上でリガンドとターゲット分子が特異的相互作用によって結合することができれば特に限定されず、後の工程 (2) でどのような原理や手段、方法を用いるかによって適宜変更し得る。例えばリガンド固定化固相担体としてリガンドが固定化された本発明の樹脂を充填したカラムを用いる場合には、液状にした試料をカラムに添加しカラム内を通すことにより簡便に実施される (カラム法)。また、簡便には当該樹脂と試料とを一定時間20 混合することによって実施できる (バッチ法)。カラムへのアプライ量、流速、溶出処理、混合時間等はアフィニティクロマトグラフィーで通常行われている条件25 に基づいて実施する。

(2) リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を同定し、解析する工程。

かかる工程は、固定化したリガンドの種類等によって適宜変更し得るが、通常当分野で実施されている低分子化合物あるいは高分子化合物を同定する為の各種方法により行う。また、今後開発されるであろう方法によつても実施可能であろう。例えばリガンド固定化固相担体としてリガンドが固定化された本発明の樹脂を充填してなるカラムを用いた場合、固相担体上のリガンドに結合したターゲット分子を緩衝液の極性を変える、あるいは過剰のリガンドをさらに加える等の処理によつて固相担体上のリガンドから解離させ、その後同定したり、あるいは固相上のリガンドと結合した状態でそのまま界面活性剤等によつて抽出して同定したりすることもできる。同定方法としては具体的には電気泳動法、免疫学的反応を用いたイムノプロッティングや免疫沈降法、クロマトグラフィー、マススペクトラム、アミノ酸シーケンス、NMR（低分子のときに特に）等の公知の手法により、またこれらの方法を組み合わせて実施する。リガンドに結合しない分子を同定する工程も上記リガンドに結合する分子を同定する方法に準じて行うことができるが、カラムの素通り画分に含まれる分子を同定の対象とするので、同定工程に入る前に予め濃縮や粗精製等の処理を行うことが好ましい。得られたデータならびに既存の報告をもとに各分子を同定し、ターゲット分子であるか否かを判断する。

また、本工程は自動化されていてもよい。例えば2次元電気泳動で得られた種々の分子のデータを直接読み取り、既存のデータベースに基づいて分子の同定を行うことも可能である。

上記したスクリーニング方法と同様な原理で、試料中のターゲット分子を測定することができる。ここで「測定」とは、試料中に存在するか否か、存在する場合にはその量、あるいはその性状の変化等、種々の操作が含まれる。かかる測定により、当該ターゲット分子あるいはリガンドが関与すると考えられている疾患の診断が可能になる。かかる診断としては、癌マーカーの検出等が例示される。本発明の方法を用いることにより、特定のタンパク質（試料中のターゲット分子）が濃縮さ

れ、結果、ノイズが低減されるので、より正確な微量なターゲット分子の検出が可能である。本発明は親水性スペーサーが組み込まれたモノマーを重合してなる樹脂の任意の用途を包含する。

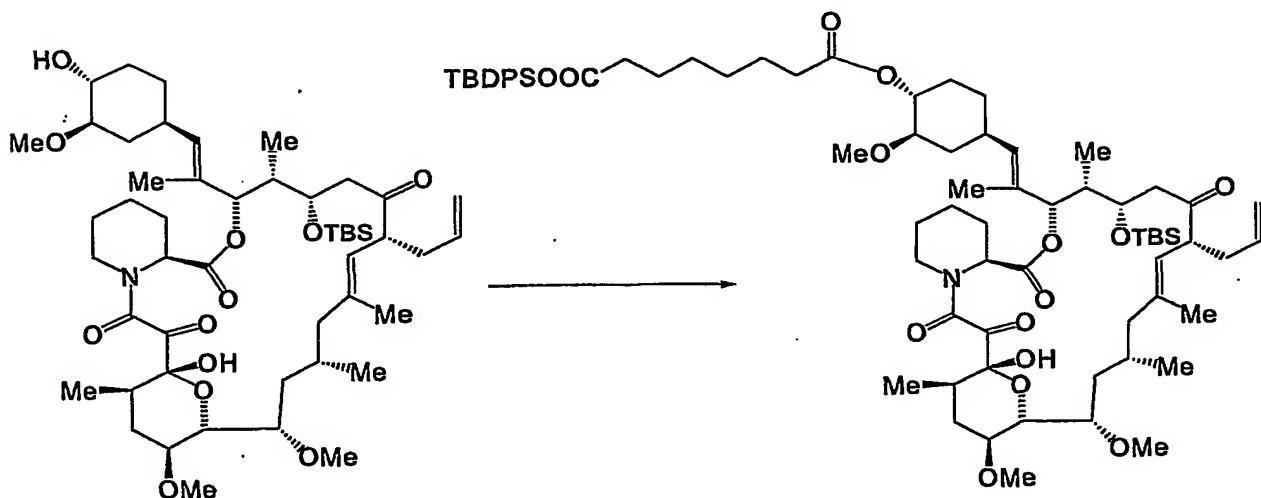
実施例

5 以下、製造例及び実験例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によりなんら限定されるものではない。また、用いる各化合物や試薬等は特に言及しない限り、商業的に入手可能であるか、また既知の報告等に基づいて調製することができる。

本製造例中の架橋剤の濃度は下記式から算出されるものである。

10 架橋剤濃度 (%) = 架橋剤のモル数 / モノマーのモル数 × 100

製造例 1 : 17-アリル-14-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-[2-[4-(7-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシカルボニル)ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチル-ビニル]-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサー-4-アザ-トリシクロ[2.2.3.1.0^{4, 9}]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオンの合成



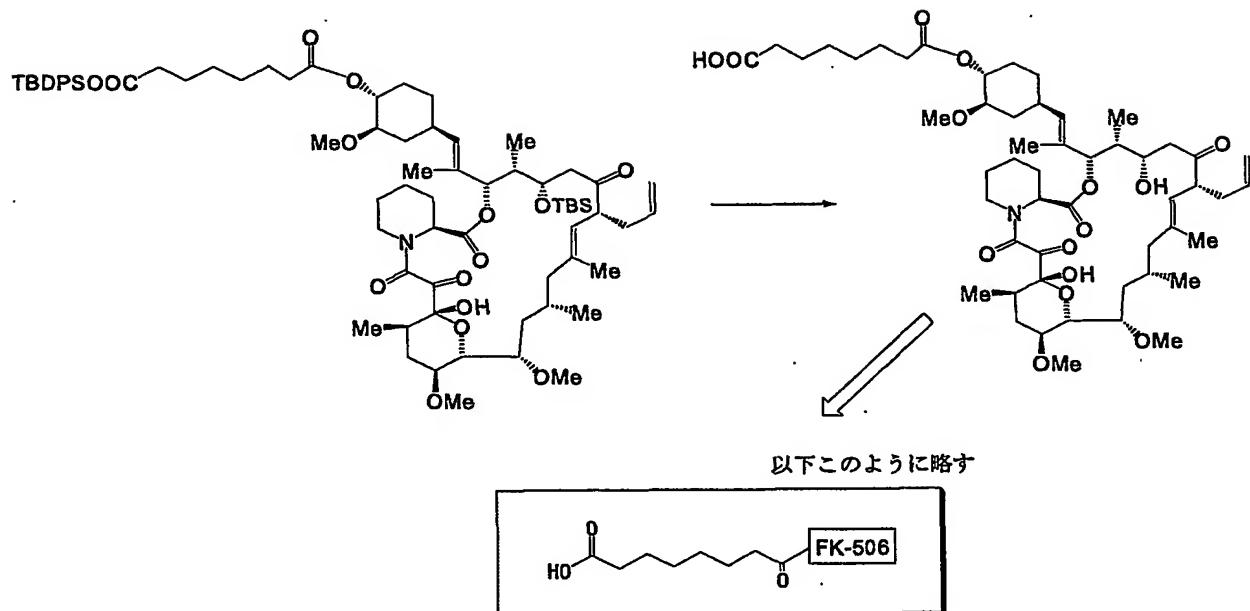
17-アリル-14-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-[2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-シクロヘキシル)-

1-メチル-ビニル] - 23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサー-4-アザートリシクロ[22.3.1.0^{4,9}]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン(138mg, 0.15mmol)、O-モノ(*tert*-ブチル-ジメチル-シラニル)オクタン二酸(8.67mg, 0.018mmol)、ジメチルアミノピリジン(DMAP; 16.5mg, 0.098mmol)、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC/HCl; 69.1mg, 0.261mmol)および塩化メチレン(CH₂Cl₂; 1ml)の混合物を室温で1.5時間攪拌した。反応物を酢酸エチル-水混合液に注ぎ、抽出した。得られた有機層を水、食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウム(MgSO₄)で乾燥した。MgSO₄を濾別後、減圧下濃縮した。こうして得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し(20%AcOEt(n-ヘキサン中)で溶出)、目的とする17-アリル-14-(*tert*-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-*tert*-ブチル-ジメチル-シラニルオキシカルボニル)ヘプタノイル-オキシ]-3-メトキシ-シクロヘキシル}-1-メチル-ビニル} - 23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサー-4-アザートリシクロ[22.3.1.0^{4,9}]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン(4.4mg, 24.6%)を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: -0.1-0.1(12H, m), 0.7-2.6(47H, m), 0.85 and 0.86(18H, s), 1.50(3H, s), 1.63(3H, s), 2.75(1H, m), 3.31(3H, s), 3.35(3H, s), 3.39(3H, s), 4.05(1H, m), 3.0-4.4(6H), 4.5-5.8(9H, m).

製造例2: 17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシ-ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチル-ビニル} - 23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサー-4-アザートリシクロ[22.3.1.0^{4,9}]オクタコ

ス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオンの合成

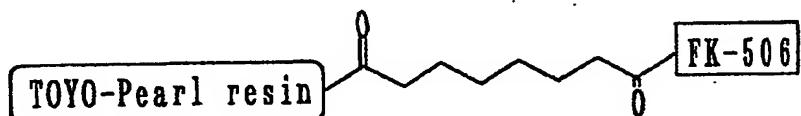


3. 1. 0^{4, 9}] オクタコスー18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (14.2 mg, 40%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0. 7-2. 6 (47H, m), 1. 50 (3H, s),
1. 63 (3H, s), 2. 75 (1H, m), 3. 31 (3H, s), 3. 35 (3H, s), 3. 39 (3H, s), 4. 05 (1H, m), 3. 0-4. 4 (6H),
4. 5-5. 8 (11H, m).

MS (m/z) : 960 (M⁺)

製造例3 : FK506付TOYOパール樹脂 (TSKgel AF-amino) の合成

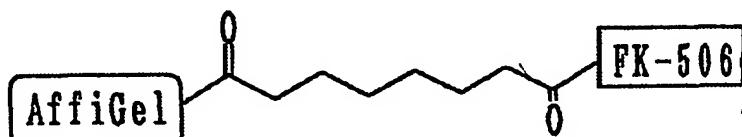


10

製造例2で調製した17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12-[2-[4-(7-カルボキシヘプタノイルオキシ)-3-メトキシシクロヘキシル]-1-メチルビニル]-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザートリシクロ [22. 3. 1. 0^{4, 9}] オクタコスー18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (38. 4 mg, 0. 04 mmol)、TOYOパール樹脂 (TSKgel AF-amino, 100 μl, 遊離アミノ基 (available amino group) は 0. 01 mmol)、EDC/HCl (9. 2 mg, 0. 048 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT; 6. 5 mg, 0. 048 mmol) およびジメチルホルムアミド (DMF; 1 ml) の混合物を室温で6時間攪拌した。反応の終点はニンヒドリン反応で残存アミノ基が肉眼で観測できなくなることで確認した。この時の反応率を換算すると約82%であった。反応終了確認後、DMFで樹脂を5回洗浄した。ここに無水酢酸 (100 μl) およびDMF (400 μl) を加え1時間室温で攪拌した。その後DMFで十分洗浄し、得られたFK506付TOYOパ

ール樹脂は後述する結合実験に用いた。TOYOパール樹脂とFK506の間に介在する基のHBA数は4、HBD数は3である（但し、FK506にあらかじめ導入された基に由来する分は数に入れない）。

製造例4：FK506付AffiGel樹脂の合成

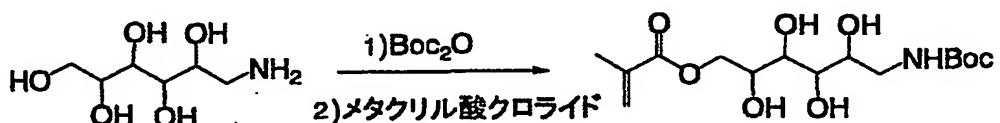


5

TOYOパール樹脂の代わりにAffiGel樹脂（Bi-o-Rad社）を用いる以外は製造例3と同様な手法によりFK506付AffiGel樹脂を合成した。得られたFK506付AffiGel樹脂は後述する結合実験に用いた。AffiGel樹脂とFK506の間に介在する基のHBA数は3、HBD数は2である（但し、FK506にあらかじめ導入された基に由来する分は数に入れない）。

10

製造例5：親水性モノマーの合成：メタクリル酸6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシルエステルの合成



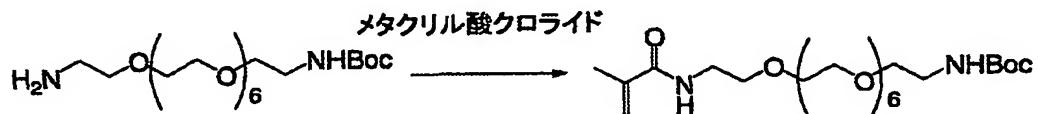
D-グルカミン（5.0 g, 27.6 mmol）に、水（100 ml）とジオキサン（100 ml）を加え、溶解させた。次いで、氷冷下ジ-tert-ブチルカルボナート（Boc₂O）（7.23 ml, 33.1 mmol）を加えた後、室温で終夜攪拌した。反応液を濃縮し、メタノールに溶解させ不溶物をろ過した後、ろ液を濃縮した。残渣を無水ピリジン（200 ml）に溶かし、氷冷下メタクリル酸クロライド（3.74 ml, 38.6 mmol）を滴下した。終夜攪拌後、濃縮し、残渣に酢酸エチルを加え、得られた有機層を2N硫酸水素カリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水、次いで飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。

固体物をろ過、減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し（クロロホルム：メタノール＝100：7で溶出）、目的とするメタクリル酸 6-*tert*-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル（3. 32 g, 34. 4%）を得た。

5 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1. 38 (9H, s), 1. 98 (3H, s),
2. 91-2. 97 (1H, m), 3. 10-3. 16 (1H, m), 3. 45 (1H, t), 3. 57-3. 61 (2H, m), 3. 72-3. 77 (1H, m), 4. 04 (1H, dd), 4. 26-4. 30 (2H, m), 4. 53 (1H, d), 4. 73 (1H, d), 4. 90 (1H, d), 5. 66 (1H, t), 6. 08 (1H, s), 6. 52 (1H, t).

10

製造例6：ポリエチレングリコール（PEG）型親水性モノマーの合成：O-（2-メタクリロイルアミノエチル）-O-（2-*tert*-ブトキシカルボニルアミノエチル）-ヘキサエチレングリコールの合成



15 O-（2-アミノエチル）-O-（2-*tert*-ブトキシカルボニルアミノエチル）-ヘキサエチレングリコール（100 mg, 213 μmol ）にジクロロメタン（1. 0 ml）とジイソプロピルアミン（55. 8 μl , 320 μmol ）を加えた後、氷冷下メタクリル酸クロライド（31. 0 μl , 320 μmol ）を滴下した。氷冷下2時間攪拌した後、酢酸エチルを加え得られた有機層を2N硫酸水素カリウム水溶液、次いで飽和食塩水で洗浄、硫酸マグネシウムで乾燥した。固体物をろ過、減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し（酢酸エチル：アセトン＝3：1で溶出）、目的とするO-（2-メタクリロイルアミノエチル）-O-（2-*tert*-ブトキシカルボニルアミノエチル）-ヘキサエチレングリコール（69. 3 mg, 61%）を得た。

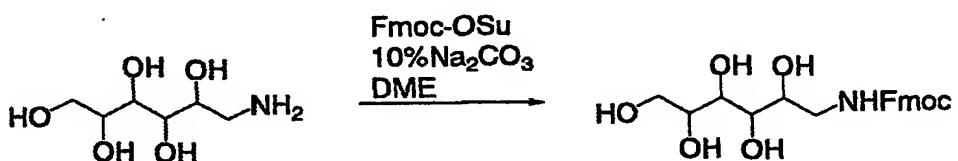
20

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1. 44 (9H, s), 1. 97 (3H, s), 3. 31-3. 33 (2H, m), 3. 50-3. 55 (4H, m), 3. 57-3. 69 (26H, m), 5. 06 (1H, b s), 5. 32 (1H, t), 5. 71 (1H, s), 6. 44 (1H, b s).

5 MS (m/z) : 537. 4 (MH⁺)

製造例7：親水性モノマーの合成

(1) (2, 3, 4, 5, 6-ペントヒドロキシ-ヘキシル)カルバミン酸9H-フルオレン-9-イルメチルエステル(Fmoc-D-グルカミン)の合成

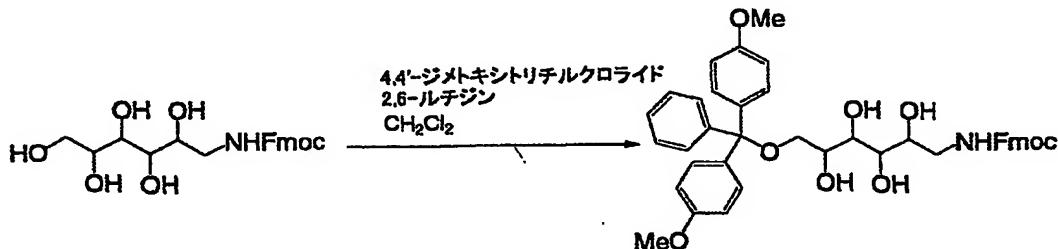


10 D-グルカミン(9.0g, 49.7mmol)を10%炭酸ナトリウム水溶液200mlと混ぜ、氷冷下攪拌した。Fmoc-OSu(16.7g, 49.7mmol)をDME 200mlに溶かし、反応系中に加え、氷冷下30分間攪拌した。析出した結晶をろ取し、結晶をH₂O×3、メタノール×3にて洗浄した。減圧下乾燥し、目的のFmoc体(2,3,4,5,6-ペントヒドロキシ-ヘキシル)カルバミン酸9H-フルオレン-9-イルメチルエステル(20g)を定量的に得た。

15 ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ : 2. 99-3. 05 (m, 1H), 3. 17-3. 20 (m, 1H), 3. 37-3. 48 (m, 3H), 3. 56-3. 63 (m, 3H), 4. 19-4. 27 (m, 4H), 4. 30-4. 33 (m, 1H), 4. 39-4. 40 (m, 1H), 4. 48-4. 49 (m, 1H), 4. 73 (m, 1H), 7. 09-7. 13 (m, 1H), 7. 35 (t, J=7. 2Hz, 2H), 7. 41 (t, J=7. 2Hz, 2H), 7. 71 (d, J=7. 2Hz), 7. 88 (d, J=7. 2Hz).

MS (m/z) 404 (MH⁺).

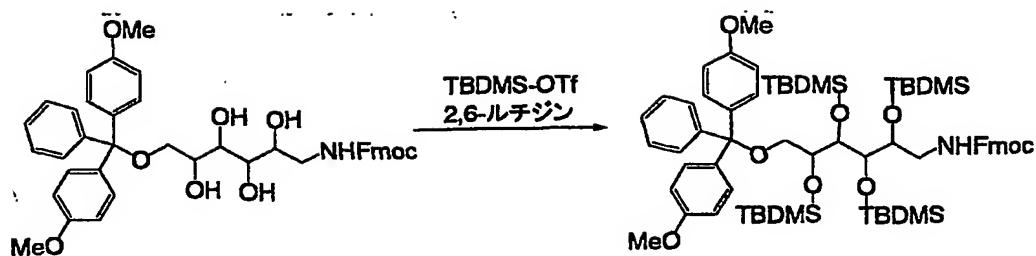
(2) {6-[ビス-(4-メトキシフェニル)-フェニルメトキシ]-2,3,4,5-テトラヒドロキシヘキシル}-カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル メチルエステルの合成



5 Fmoc-D-グルカミン (5.0 g, 12.4 mmol) をピリジン 100 ml に溶かし共沸した。この操作を 2 回行った後、乾燥ピリジン 100 ml に溶かし、窒素気流下冰冷した。4,4'-ジメトキシトリチルクロライド (5.0 g, 14.9 mmol)、DMAP (1.5 g, 12.4 mmol) を加え、冰冷下から室温にゆっくりと昇温し、室温にて 17 時間攪拌した。ピリジンを減圧留去した後、酢酸エチル 500 ml にて希釈した。水を加えた後、有機層を分離後、再び水層を酢酸エチルにて抽出した。酢酸エチル層は飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃ : MeOH = 10 : 1) にて精製し、目的の化合物 (5.06 g) を収率 57.9 % にて得た。

15 ¹H-NMR (d-アセトン) δ : 3.23-3.38 (m, 4H), 3.67-3.95 (m, 6H), 3.77 (s, 6H), 4.05 (d, 1H), 4.18-4.24 (m, 2H), 4.31-4.33 (m, 2H), 6.51 (m, 1H), 6.86 (d, 4H), 7.17-7.42 (m, 1H), 7.51 (d, 2H), 7.70 (d, 2H), 7.86 (d, 2H).

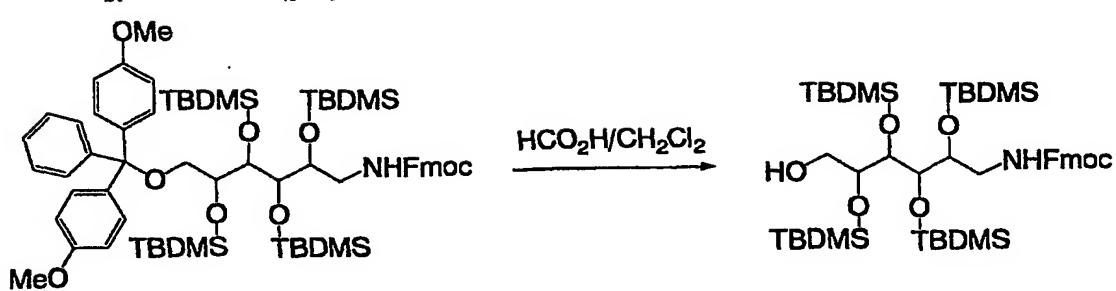
20 (3) [6-[ビス-(4-メトキシフェニル)-フェニルメトキシ]-2,3,4,5-テトラキス-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-ヘキシル]-カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル メチルエステルの合成



{6-[ビス-(4-メトキシフェニル)-フェニルメトキシ]-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル}-カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル メチルエステル (2. 46 g, 3. 49 mmol) を2, 6-ルチジン (1. 5 g, 14.0 mmol) に溶かし、氷冷下攪拌した。TBDMs-OTf (18. 4 g, 69. 8 mmol) をゆっくりと加えた。氷冷下から室温へ戻し、一昼夜攪拌した。ジクロロメタン200ml、水200mlを加え、室温にて2時間攪拌した。有機層を分離後、水層をさらにジクロロメタン200mlにて抽出した。ジクロロメタン層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥し、減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン:酢酸エチル=5:1) にて精製し、目的の化合物 (3. 5 g) を収率86. 4%にて得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: -0. 1-0. 2 (m, 24H), 0. 72 (s, 9H), 0. 75 (s, 9H), 0. 91-0. 96 (m, 18H), 3. 25 (d, 1H), 3. 35-3. 50 (m, 3H), 3. 59 (m, 1H), 3. 75 (s, 6H), 3. 80 (m, 1H), 4. 03-4. 19 (m, 3H), 4. 29-4. 41 (m, 2H), 5. 18 (m, 1H), 6. 76 (d, J=8. 4Hz, 4H), 7. 15-7. 21 (m, 9H), 7. 27-7. 34 (m, 4H), 7. 47 (t, J=7. 2Hz, 2H), 7. 65 (d, J=7. 2Hz, 2H).

(4) [2, 3, 4, 5-テトラキス-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-6-ヒドロキシヘキシル]-カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イルメチルエステルの合成

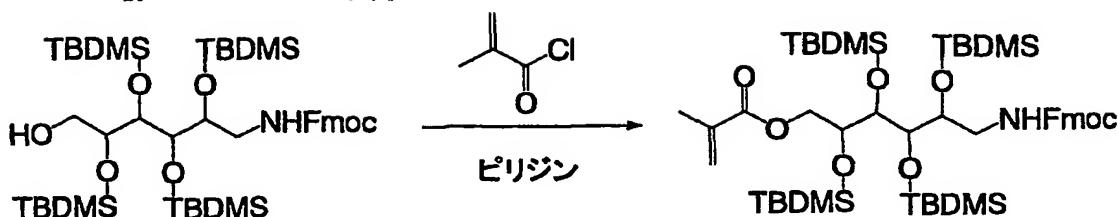


[6- [ビス-(4-メトキシフェニル)-フェニルメトキシ]-2, 3, 4, 5-テトラキス-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-ヘキシル]カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル メチルエステル (1. 16 g, 1 mmol) を (ギ酸:ジクロロメタン=1:10) 溶液 10 ml に溶かし、室温にて2時間攪拌した。飽和重曹水に反応液を注ぎ込み、ジクロロメタン 100 ml にて抽出した。ジクロロメタン層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン:酢酸エチル=10:1~5:1) にて精製し、目的のアルコール体 (600 mg) を収率 69. 8 % にて得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: -0.50~0.10 (m, 24H), 0.77~0.87 (m, 36H), 2.10 (m, 1H), 3.29~3.36 (m, 1H), 3.43~3.56 (m, 2H), 3.57~3.61 (m, 1H), 3.65~3.71 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 4.03 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.27~4.32 (m, 2H), 4.90 (m, 1H), 7.17~7.21 (m, 2H), 7.29 (t, J=7.6 Hz, 2H), 7.49 (t, J=7.6 Hz, 2H), 7.66 (d, J=7.6 Hz, 2H).

MS (m/z) 860 (MH⁺).

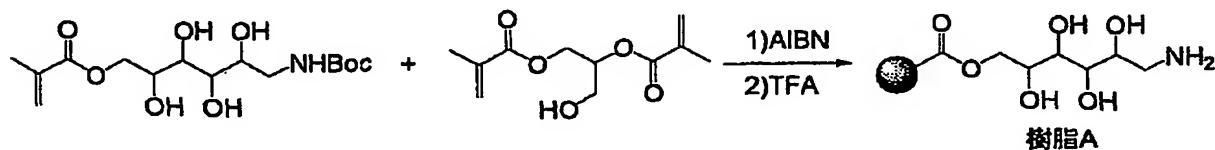
(5) 2-メチル-アクリル酸 2, 3, 4, 5-テトラキス-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-6-(9H-フルオレン-9-イル メトキシカルボニルアミノ)-ヘキシル エステルの合成



[2, 3, 4, 5-テトラキス-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-6-ヒドロキシヘキシル]-カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イルメチルエステル (460mg, 0.54mmol) に、ジクロロメタン (10ml) を加え、窒素気流下、5°Cにて攪拌した。次いで、メタクリル酸クロライド (560mg, 5.4mmol) を滴下した。氷冷下30分攪拌し後、室温にて30分間攪拌した。反応系中に水を加え、酢酸エチルにて2回抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。固体物をろ過、減圧濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、目的とする2-メチルアクリル酸 2, 3, 4, 5-テトラキス-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-6-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-ヘキシルエステル (200mg, 39%)を得た。

¹H-NMR (d-アセトン) δ : 0.0-0.10 (24H, m), 0.91 (36H, m), 1.95 (3H, s), 3.45 (1H, m), 3.55 (1H, m), 3.60 (1H, m), 3.90-4.95 (7H, m), 5.00 (1H, m), 5.55 (1H, m), 6.10 (1H, s), 7.29 (2H, m), 7.39 (2H, t), 7.58 (2H, t), 7.75 (2H, d).

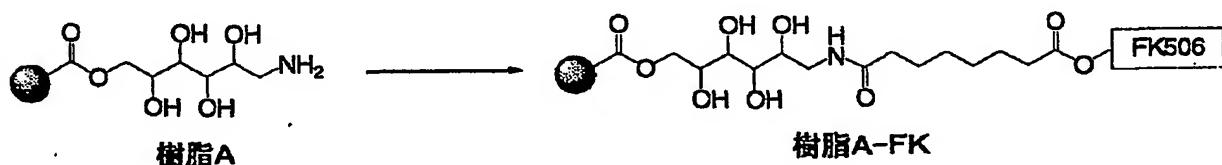
製造例8：樹脂Aの合成



20 製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-

2, 3, 4, -5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (300 mg, 859 μ mol) に、1, 4-ジオキサン (750 μ l)、グリセロール ジメタクリレート (3.50 μ l, 17 μ mol; 架橋剤濃度約2.0%) およびアゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 1. 65 mg) を加え、窒素気流下100°Cで2時間反応させた。
 5 得られた不溶物をジメチルホルムアミド (DMF)、メタノール、ジエチルエーテルで十分に洗浄した後、減圧下乾燥させた。得られた樹脂257 mg (84. 6%) のうち、200 mg にトリフルオロ酢酸：ジクロロメタン：1, 4-ジオキサン=2:1:1 混合溶液 40 ml を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、樹脂を1, 4-ジオキサン、メタノール、ジエチルエーテル、DMF で十分洗浄した後、10 5%ジイソプロピルエチルアミン/N-メチル-2-ピロリドン (NMP) 溶液中、室温で終夜攪拌した。次いで、NMP、メタノール、ジエチルエーテル、DMF、メタノールで十分に洗浄した後、減圧下乾燥し、目的とする樹脂A (141 mg)を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約4. 9 μ mol/mg のアミノ基が存在することを確認した。

15 製造例9: FK506付樹脂A: 樹脂A-FKの合成



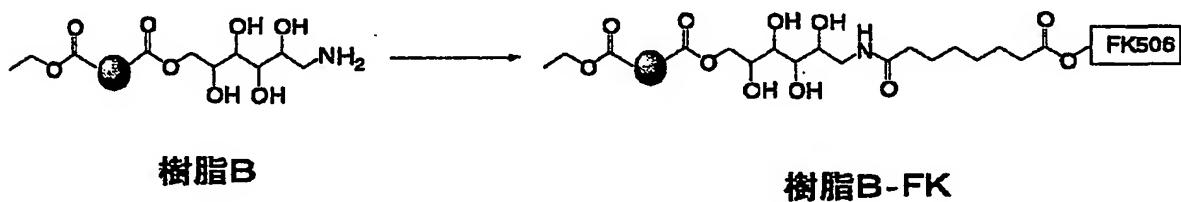
20 製造例8で調製した樹脂A (20. 0 mg、遊離アミノ基 (available amino group) は98 μ mol)、17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシ-ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザ-トリシクロ[22. 3. 1. 0^{4, 9}]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオノン (9. 4 mg, 9. 8 μ mol)、EDC/HC1 (4. 5 mg, 23 μ mol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT; 3. 2 mg, 24 μ mol) およ

びN-メチル-2-ピロリドン (NMP; 0. 5 ml) の混合物を室温で終夜攪拌した。反応の終点はHPLCにて17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチルビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザ-トリシクロ[22.3.1.0^{4,9}]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオンがほぼ消失することで確認した。この時の反応率を換算すると約9%であった。反応終了確認後、DMF、メタノール、ジエチルエーテル、DMF:H₂O=1:1で樹脂を十分洗浄した。ここに無水酢酸:DMF=1:9 (1. 5 ml) を加え1時間室温で攪拌した。メタノールで洗浄後、ニンヒドリン反応による反応確認を行い、残存アミノ基が肉眼で観測できなくなるまで無水酢酸:DMF=1:9 混合溶液による反応を繰り返した。反応終了確認後、DMF、メタノール、ジエチルエーテルで十分洗浄後、得られたFK506付樹脂A (樹脂A-FK) は後述する結合実験に用いた。

10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995
1000
1005
1010
1015
1020
1025
1030
1035
1040
1045
1050
1055
1060
1065
1070
1075
1080
1085
1090
1095
1100
1105
1110
1115
1120
1125
1130
1135
1140
1145
1150
1155
1160
1165
1170
1175
1180
1185
1190
1195
1200
1205
1210
1215
1220
1225
1230
1235
1240
1245
1250
1255
1260
1265
1270
1275
1280
1285
1290
1295
1300
1305
1310
1315
1320
1325
1330
1335
1340
1345
1350
1355
1360
1365
1370
1375
1380
1385
1390
1395
1400
1405
1410
1415
1420
1425
1430
1435
1440
1445
1450
1455
1460
1465
1470
1475
1480
1485
1490
1495
1500
1505
1510
1515
1520
1525
1530
1535
1540
1545
1550
1555
1560
1565
1570
1575
1580
1585
1590
1595
1600
1605
1610
1615
1620
1625
1630
1635
1640
1645
1650
1655
1660
1665
1670
1675
1680
1685
1690
1695
1700
1705
1710
1715
1720
1725
1730
1735
1740
1745
1750
1755
1760
1765
1770
1775
1780
1785
1790
1795
1800
1805
1810
1815
1820
1825
1830
1835
1840
1845
1850
1855
1860
1865
1870
1875
1880
1885
1890
1895
1900
1905
1910
1915
1920
1925
1930
1935
1940
1945
1950
1955
1960
1965
1970
1975
1980
1985
1990
1995
2000
2005
2010
2015
2020
2025
2030
2035
2040
2045
2050
2055
2060
2065
2070
2075
2080
2085
2090
2095
2100
2105
2110
2115
2120
2125
2130
2135
2140
2145
2150
2155
2160
2165
2170
2175
2180
2185
2190
2195
2200
2205
2210
2215
2220
2225
2230
2235
2240
2245
2250
2255
2260
2265
2270
2275
2280
2285
2290
2295
2300
2305
2310
2315
2320
2325
2330
2335
2340
2345
2350
2355
2360
2365
2370
2375
2380
2385
2390
2395
2400
2405
2410
2415
2420
2425
2430
2435
2440
2445
2450
2455
2460
2465
2470
2475
2480
2485
2490
2495
2500
2505
2510
2515
2520
2525
2530
2535
2540
2545
2550
2555
2560
2565
2570
2575
2580
2585
2590
2595
2600
2605
2610
2615
2620
2625
2630
2635
2640
2645
2650
2655
2660
2665
2670
2675
2680
2685
2690
2695
2700
2705
2710
2715
2720
2725
2730
2735
2740
2745
2750
2755
2760
2765
2770
2775
2780
2785
2790
2795
2800
2805
2810
2815
2820
2825
2830
2835
2840
2845
2850
2855
2860
2865
2870
2875
2880
2885
2890
2895
2900
2905
2910
2915
2920
2925
2930
2935
2940
2945
2950
2955
2960
2965
2970
2975
2980
2985
2990
2995
3000
3005
3010
3015
3020
3025
3030
3035
3040
3045
3050
3055
3060
3065
3070
3075
3080
3085
3090
3095
3100
3105
3110
3115
3120
3125
3130
3135
3140
3145
3150
3155
3160
3165
3170
3175
3180
3185
3190
3195
3200
3205
3210
3215
3220
3225
3230
3235
3240
3245
3250
3255
3260
3265
3270
3275
3280
3285
3290
3295
3300
3305
3310
3315
3320
3325
3330
3335
3340
3345
3350
3355
3360
3365
3370
3375
3380
3385
3390
3395
3400
3405
3410
3415
3420
3425
3430
3435
3440
3445
3450
3455
3460
3465
3470
3475
3480
3485
3490
3495
3500
3505
3510
3515
3520
3525
3530
3535
3540
3545
3550
3555
3560
3565
3570
3575
3580
3585
3590
3595
3600
3605
3610
3615
3620
3625
3630
3635
3640
3645
3650
3655
3660
3665
3670
3675
3680
3685
3690
3695
3700
3705
3710
3715
3720
3725
3730
3735
3740
3745
3750
3755
3760
3765
3770
3775
3780
3785
3790
3795
3800
3805
3810
3815
3820
3825
3830
3835
3840
3845
3850
3855
3860
3865
3870
3875
3880
3885
3890
3895
3900
3905
3910
3915
3920
3925
3930
3935
3940
3945
3950
3955
3960
3965
3970
3975
3980
3985
3990
3995
4000
4005
4010
4015
4020
4025
4030
4035
4040
4045
4050
4055
4060
4065
4070
4075
4080
4085
4090
4095
4100
4105
4110
4115
4120
4125
4130
4135
4140
4145
4150
4155
4160
4165
4170
4175
4180
4185
4190
4195
4200
4205
4210
4215
4220
4225
4230
4235
4240
4245
4250
4255
4260
4265
4270
4275
4280
4285
4290
4295
4300
4305
4310
4315
4320
4325
4330
4335
4340
4345
4350
4355
4360
4365
4370
4375
4380
4385
4390
4395
4400
4405
4410
4415
4420
4425
4430
4435
4440
4445
4450
4455
4460
4465
4470
4475
4480
4485
4490
4495
4500
4505
4510
4515
4520
4525
4530
4535
4540
4545
4550
4555
4560
4565
4570
4575
4580
4585
4590
4595
4600
4605
4610
4615
4620
4625
4630
4635
4640
4645
4650
4655
4660
4665
4670
4675
4680
4685
4690
4695
4700
4705
4710
4715
4720
4725
4730
4735
4740
4745
4750
4755
4760
4765
4770
4775
4780
4785
4790
4795
4800
4805
4810
4815
4820
4825
4830
4835
4840
4845
4850
4855
4860
4865
4870
4875
4880
4885
4890
4895
4900
4905
4910
4915
4920
4925
4930
4935
4940
4945
4950
4955
4960
4965
4970
4975
4980
4985
4990
4995
5000
5005
5010
5015
5020
5025
5030
5035
5040
5045
5050
5055
5060
5065
5070
5075
5080
5085
5090
5095
5100
5105
5110
5115
5120
5125
5130
5135
5140
5145
5150
5155
5160
5165
5170
5175
5180
5185
5190
5195
5200
5205
5210
5215
5220
5225
5230
5235
5240
5245
5250
5255
5260
5265
5270
5275
5280
5285
5290
5295
5300
5305
5310
5315
5320
5325
5330
5335
5340
5345
5350
5355
5360
5365
5370
5375
5380
5385
5390
5395
5400
5405
5410
5415
5420
5425
5430
5435
5440
5445
5450
5455
5460
5465
5470
5475
5480
5485
5490
5495
5500
5505
5510
5515
5520
5525
5530
5535
5540
5545
5550
5555
5560
5565
5570
5575
5580
5585
5590
5595
5600
5605
5610
5615
5620
5625
5630
5635
5640
5645
5650
5655
5660
5665
5670
5675
5680
5685
5690
5695
5700
5705
5710
5715
5720
5725
5730
5735
5740
5745
5750
5755
5760
5765
5770
5775
5780
5785
5790
5795
5800
5805
5810
5815
5820
5825
5830
5835
5840
5845
5850
5855
5860
5865
5870
5875
5880
5885
5890
5895
5900
5905
5910
5915
5920
5925
5930
5935
5940
5945
5950
5955
5960
5965
5970
5975
5980
5985
5990
5995
6000
6005
6010
6015
6020
6025
6030
6035
6040
6045
6050
6055
6060
6065
6070
6075
6080
6085
6090
6095
6100
6105
6110
6115
6120
6125
6130
6135
6140
6145
6150
6155
6160
6165
6170
6175
6180
6185
6190
6195
6200
6205
6210
6215
6220
6225
6230
6235
6240
6245
6250
6255
6260
6265
6270
6275
6280
6285
6290
6295
6300
6305
6310
6315
6320
6325
6330
6335
6340
6345
6350
6355
6360
6365
6370
6375
6380
6385
6390
6395
6400
6405
6410
6415
6420
6425
6430
6435
6440
6445
6450
6455
6460
6465
6470
6475
6480
6485
6490
6495
6500
6505
6510
6515
6520
6525
6530
6535
6540
6545
6550
6555
6560
6565
6570
6575
6580
6585
6590
6595
6600
6605
6610
6615
6620
6625
6630
6635
6640
6645
6650
6655
6660
6665
6670
6675
6680
6685
6690
6695
6700
6705
6710
6715
6720
6725
6730
6735
6740
6745
6750
6755
6760
6765
6770
6775
6780
6785
6790
6795
6800
6805
6810
6815
6820
6825
6830
6835
6840
6845
6850
6855
6860
6865
6870
6875
6880
6885
6890
6895
6900
6905
6910
6915
6920
6925
6930
6935
6940
6945
6950
6955
6960
6965
6970
6975
6980
6985
6990
6995
7000
7005
7010
7015
7020
7025
7030
7035
7040
7045
7050
7055
7060
7065
7070
7075
7080
7085
7090
7095
7100
7105
7110
7115
7120
7125
7130
7135
7140
7145
7150
7155
7160
7165
7170
7175
7180
7185
7190
7195
7200
7205
7210
7215
7220
7225
7230
7235
7240
7245
7250
7255
7260
7265
7270
7275
7280
7285
7290
7295
7300
7305
7310
7315
7320
7325
7330
7335
7340
7345
7350
7355
7360
7365
7370
7375
7380
7385
7390
7395
7400
7405
7410
7415
7420
7425
7430
7435
7440
7445
7450
7455
7460
7465
7470
7475
7480
7485
7490
7495
7500
7505
7510
7515
7520
7525
7530
7535
7540
7545
7550
7555
7560
7565
7570
7575
7580
7585
7590
7595
7600
7605
7610
7615
7620
7625
7630
7635
7640
7645
7650
7655
7660
7665
7670
7675
7680
7685
7690
7695
7700
7705
7710
7715
7720
7725
7730
7735
7740
7745
7750
7755
7760
7765
7770
7775
7780
7785
7790
7795
7800
7805
7810
7815
7820
7825
7830
7835
7840
7845
7850
7855
7860
7865
7870
7875
7880
7885
7890
7895
7900
7905
7910
7915
7920
7925
7930
7935
7940
7945
7950
7955
7960
7965
7970
7975
7980
7985
7990
7995
8000
8005
8010
8015
8020
8025
8030
8035
8040
8045
8050
8055
8060
8065
8070
8075
8080
8085
8090
8095
8100
8105
8110
8115
8120
8125
8130
8135
8140
8145
8150
8155
8160
8165
8170
8175
8180
8185
8190
8195
8200
8205
8210
8215
8220
8225
8230
8235
8240
8245
8250
8255
8260
8265
8270
8275
8280
8285
8290
8295
8300
8305
8310
8315
8320
8325
8330
8335
8340
8345
8350
8355
8360
8365
8370
8375
8380
8385
8390
8395
8400
8405
8410
8415
8420
8425
8430
8435
8440
8445
8450
8455
8460
8465
8470
8475
8480
8485
8490
8495
8500
8505
8510
8515
8520
8525
8530
8535
8540
8545
8550
8555
8560
8565
8570
8575
8580
8585
8590
8595
8600
8605
8610
8615
8620
8625
8630
8635
8640
8645
8650
8655
8660
8665
8670
8675
8680
8685
8690
8695
8700
8705
8710
8715
8720
8725
8730
8735
8740
8745
8750
8755
8760
8765
8770
8775
8780
8785
8790
8795
8800
8805
8810
8815
8820
8825
8830
8835
8840
8845
8850
8855
8860
8865
8870
8875
8880
8885
8890
8895
8900
8905
8910
8915
8920
8925
8930
8935
8940
8945
8950
8955
8960
8965
8970
8975
8980
8985
8990
8995
9000
9005
9010
9015
9020
9025
9030
9035
9040
9045
9050
9055
9060
9065
9070
9075
9080
9085
9090
9095
9100
9105
9110
9115
9120
9125
9130
9135
9140
9145
9150
9155
9160
9165
9170
9175
9180
9185
9190
9195
9200
9205
921

を加え、窒素気流下 100°C で 24 時間反応させた。得られた不溶物をジメチルホルムアミド (DMF)、メタノール、ジエチルエーテルで十分に洗浄した後、減圧下乾燥させた。得られた樹脂 101 mg (72%) にトリフルオロ酢酸：ジクロロメタン = 1 : 1 混合溶液 8 ml を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、樹脂を DMF で十分洗浄した後、5% ジイソプロピルエチルアミン/DMF 溶液中、室温で終夜攪拌した。次いで、DMF、ジエチルエーテルで十分に洗浄した後、減圧下乾燥し、目的とする共重合体 (85 mg) を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約 0.63 μmol/mg のアミノ基が存在することを確認した。

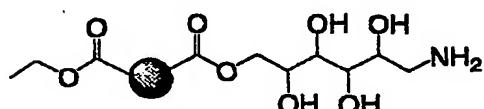
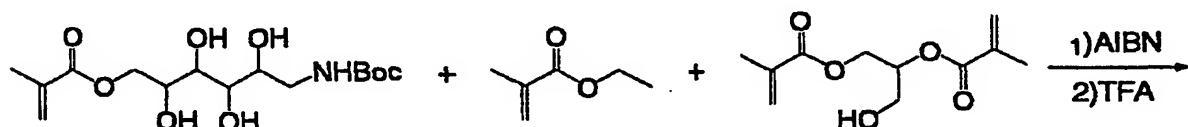
5 製造例 11：FK506 付樹脂 B：樹脂 B-FK の合成



10 製造例 10 で調製した樹脂 B (16 mg、遊離アミノ基 (available amino group) は 10 μmol)、17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12-[2-[4-(7-カルボキシヘプタノイルオキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチルビニル]-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[2.3.1.0^{4,9}]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (3.4 mg, 0.04 mmol)、EDC/HCl (9.2 mg, 0.048 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT; 6.5 mg, 0.048 mmol) およびジメチルホルムアミド (DMF; 0.5 ml) の混合物を室温で終夜攪拌した。反応の終点はニンヒドリン反応で残存アミノ基が肉眼で観測できなくなることで確認した。この時の反応率を換算すると 100% であった。反応終了確認後、DMF、メタノール、ジエチルエーテルで樹脂を十分洗浄した。ここに無水酢酸:メタノール:N-メチル-2-ピロリドン (NMP) = 1:1:8 混合溶液 (1.

0 m l) を加え 1 時間室温で攪拌した。その後 DMF、メタノール、ジエチルエーテルで十分洗浄し、F.K 506 付樹脂 B (樹脂 B-F.K) を得た。

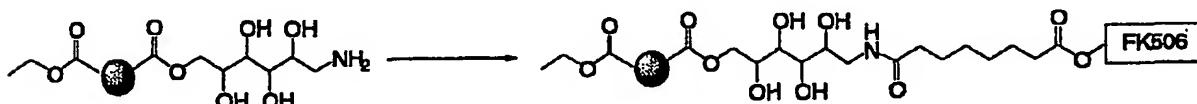
製造例12：メタクリル酸エチルとの共重合による樹脂Cの合成



樹脂C

5 製造例8と同様にして、製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブト
キシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (9
0 mg, 258 μ mol)、メタクリル酸エチル (289 μ l, 2.32 mmol)、
グリセロール ジメタクリレート (10.5 μ l, 43.8 μ mol; 架橋剤濃度
約1.7%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 4.2 mg) および1, 4
10 一ジオキサン (750 μ l) を用いて、樹脂C (141 mg) を得た。なお、ニン
ヒドリン反応により樹脂中に約 1.5 μ mol/mg のアミノ基が存在することを
確認した。

製造例 13 : FK506付樹脂C : 樹脂C-FKの合成



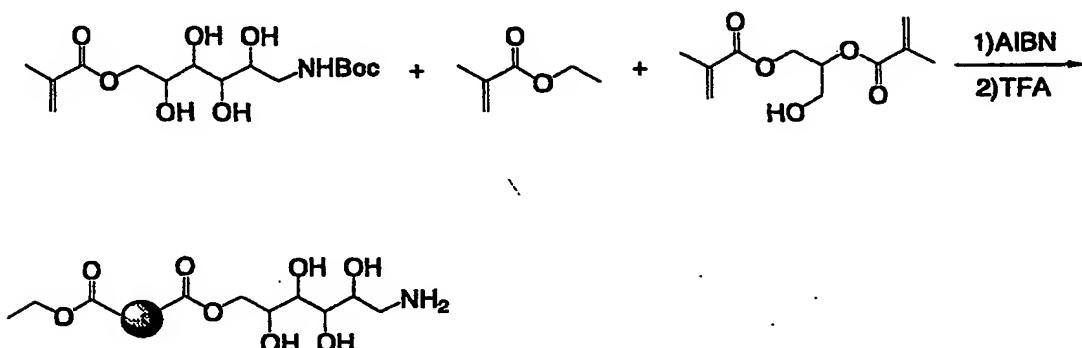
樹脂C

樹脂C-FK

15 製造例12で調製した樹脂C (6.7 mg、遊離アミノ基 (available amino group) は $10 \mu\text{mol}$) より、製造例11と同様にしてFK5

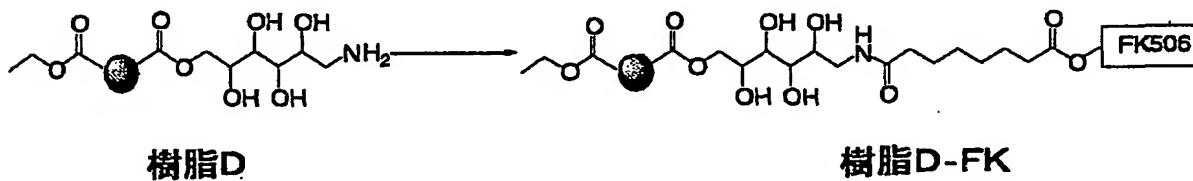
0 6付樹脂C-(樹脂C-FK)を得た。

製造例14：メタクリル酸エチルとの共重合による樹脂Dの合成



5 製造例8と同様にして、製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブチル
キシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (1
50 mg, 429 μ mol)、メタクリル酸エチル (441 μ l, 3.86 mmol)、
グリセロール ジメタクリレート (17.5 μ l, 73.0 μ mol; 架橋剤濃度
約1.7%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 7.1 mg) および1, 4
-ジオキサン (750 μ l) を用いて、樹脂D (117 mg) を得た。なお、ニン
10 ヒドリン反応により樹脂中に約1.3 μ mol/mgのアミノ基が存在することを
確認した。

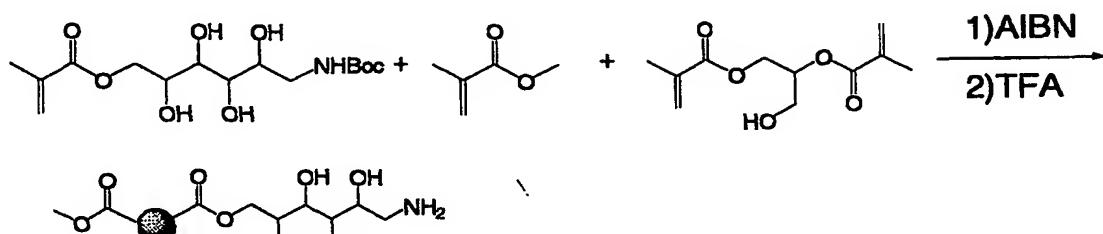
製造例15：FK506付樹脂D：樹脂D-FKの合成



15 製造例14で調製した樹脂D (7.7 mg、遊離アミノ基 (available
amino group) は10 μ mol) より、製造例11と同様にしてFK5

0.6付樹脂D-(樹脂D-FK)を得た。

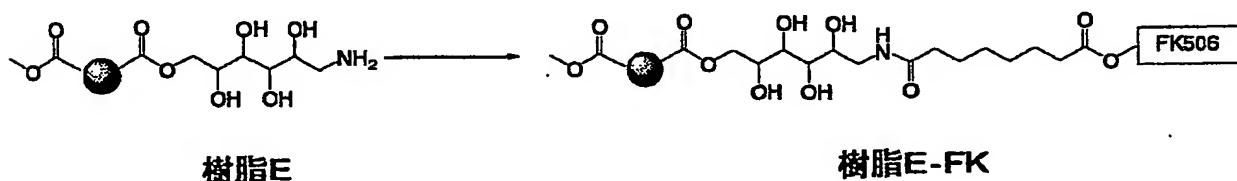
製造例16：メタクリル酸メチルとの共重合による樹脂Eの合成



樹脂E

5 製造例8と同様にして、製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブト
キシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (3
0 mg, 85.9 μmol)、メタクリル酸メチル (82.7 μl, 773 μmol)、
グリセロール ジメタクリレート (20.6 μl, 85.9 μmol; 架橋剤濃度
約10%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 1.4 mg) および1, 4-
ジオキサン (750 μl) を用いて、樹脂E (59 mg)を得た。なお、ニンヒド
10 リン反応により樹脂中に約0.89 μmol/mgのアミノ基が存在することを確
認した。

製造例17：FK5.06付樹脂E：樹脂E-FKの合成

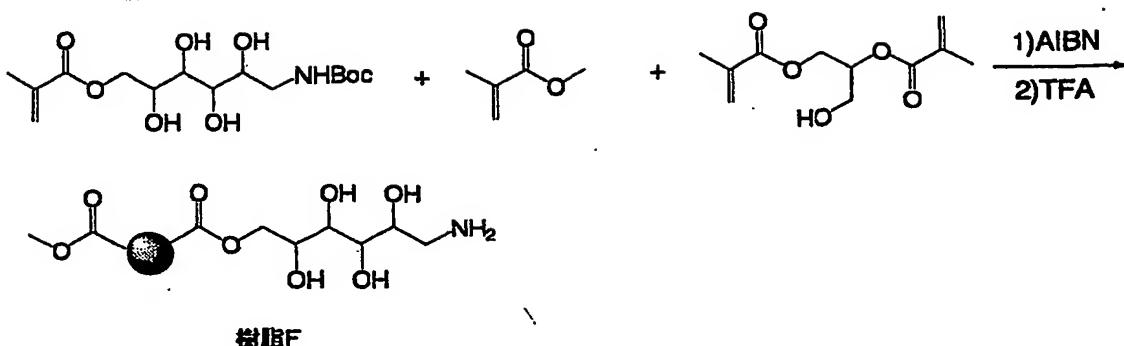


樹脂E

樹脂E-FK

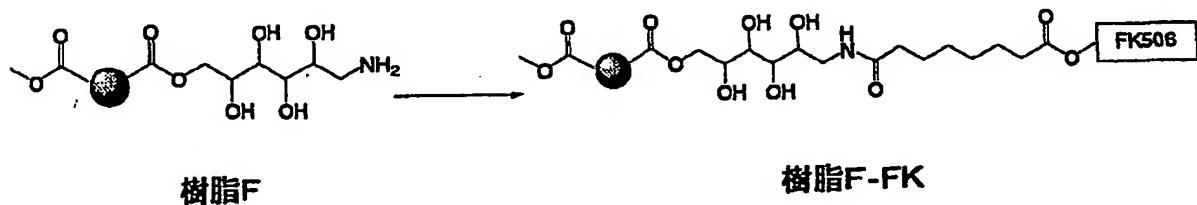
15 製造例16で調製した樹脂E (11 mg、遊離アミノ基 (available a
mino group) は10 μmol) より、製造例11と同様にしてFK50
6付樹脂E (樹脂E-FK)を得た。

製造例18：メタクリル酸メチルとの共重合による樹脂Fの合成



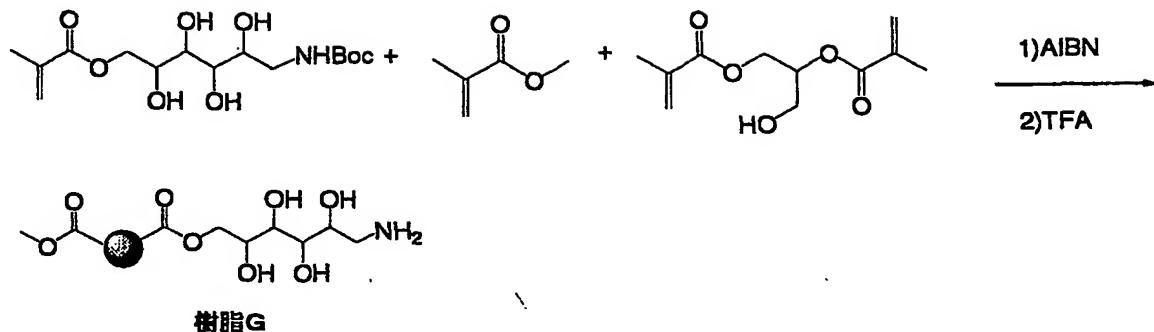
5 製造例8と同様にして、製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブートキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル(9.0mg, 258 μ mol)、メタクリル酸メチル(248 μ l, 2.32mmol)、
グリセロール ジメタクリレート(10.5 μ l, 43.8 μ mol; 架橋剤濃度約1.7%)、アゾビスイソブチロニトリル(AIBN: 4.2mg)および1, 4-ジオキサン(750 μ l)を用いて、樹脂F(171mg)を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約0.84 μ mol/mgのアミノ基が存在することを確認した。

10 製造例19: FK506付樹脂F:樹脂F-FKの合成



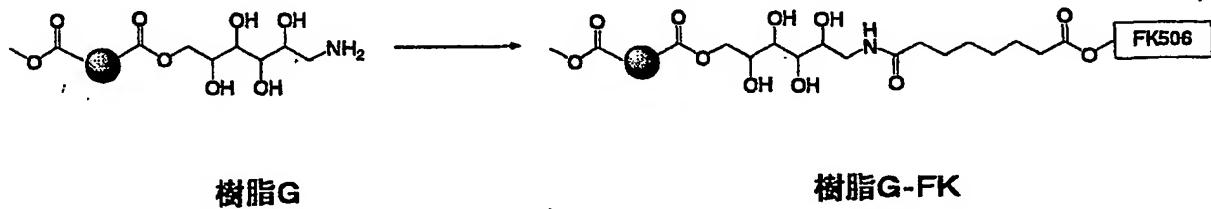
15 製造例18で調製した樹脂F(12mg、遊離アミノ基(availabile amino group)は10 μ mol)より、製造例11と同様にしてFK506付樹脂F(樹脂F-FK)を得た。

15 製造例20: メタクリル酸メチルとの共重合による樹脂Gの合成



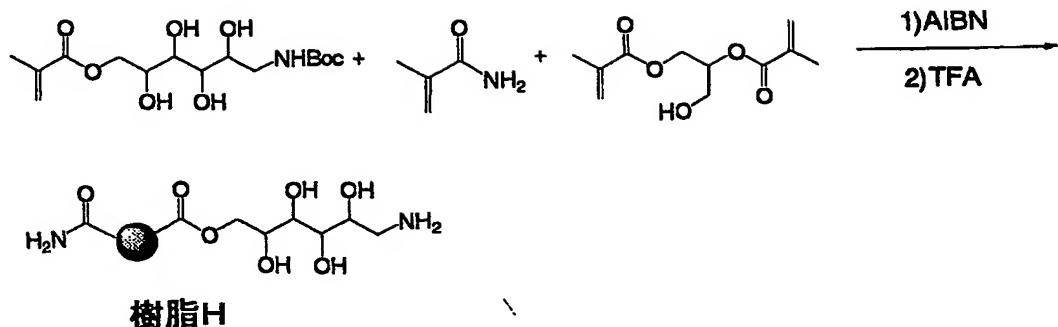
5 製造例 8 と同様にして、製造例 5 で調製したメタクリル酸 6-tert-ブチル
キシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (1
50 mg, 429 μ mol)、メタクリル酸メチル (413 μ l, 3.86 mmol)、
グリセロール ジメタクリレート (17.5 μ l, 73.0 μ mol; 架橋剤濃度
約 1.7%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 7.1 mg) および 1, 4-
ジオキサン (750 μ l) を用いて、樹脂 G (243 mg) を得た。なお、ニン
ヒドリン反応により樹脂中に約 1.5 μ mol/mg のアミノ基が存在することを
確認した。

10 製造例 21: FK506 付樹脂 G: 樹脂 G-FK の合成



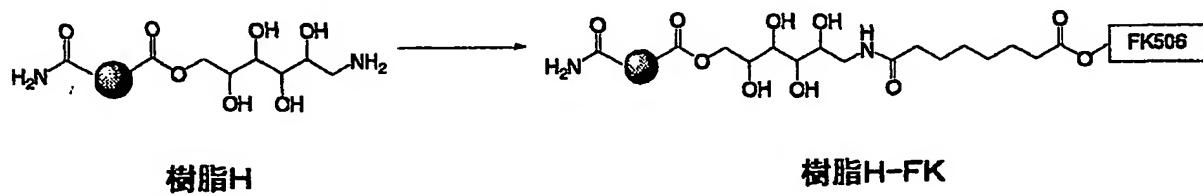
15 製造例 20 で調製した樹脂 G (6.5 mg、遊離アミノ基 (available amino group) は 10 μ mol) より、製造例 11 と同様にして FK506 付樹脂 G (樹脂 G-FK) を得た。

15 製造例 22: メタクリルアミドとの共重合による樹脂 H の合成



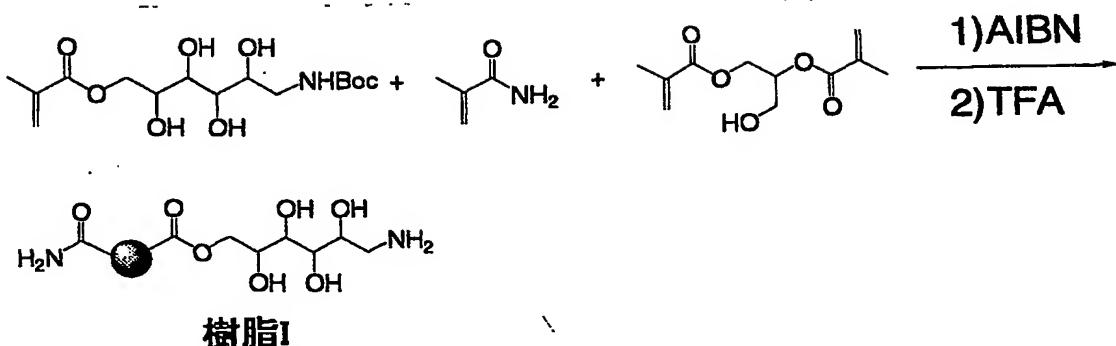
製造例8と同様にして、製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (30 mg, 85. 9 μmol)、メタクリルアミド (65. 8 mg, 773 μmol)、グリセロール ジメタクリレート (20. 6 μl, 85. 9 μmol; 架橋剤濃度約10. 0%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 1. 4 mg) および1, 4-ジオキサン (750 μl) を用いて、樹脂H (9. 7 mg) を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約0. 72 μmol/mg のアミノ基が存在することを確認した。

10 製造例23：FK506付樹脂H：樹脂H-FKの合成



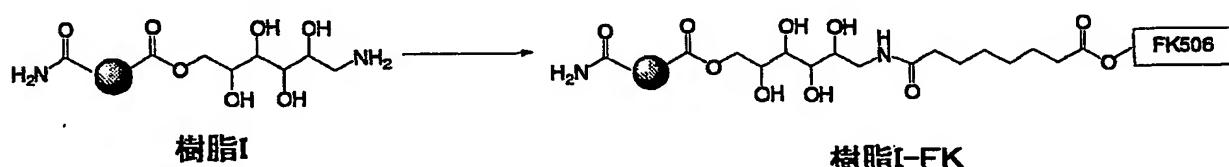
製造例22で調製した樹脂H (4.2 mg、遊離アミノ基 (available amino group) は $3.0 \mu\text{mol}$) より製造例11に述べた方法に準じ、目的とするFK506付樹脂H (樹脂H-FK) を得た。

15 製造例24：メタクリルアミドとの共重合による樹脂Iの合成



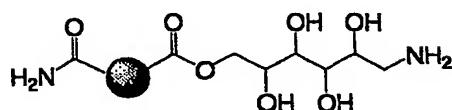
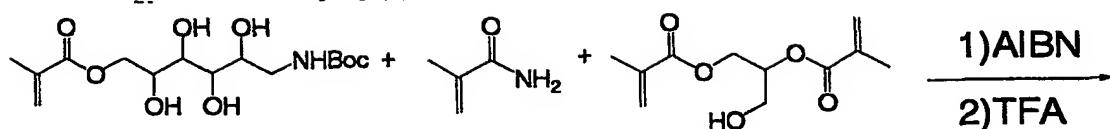
製造例8と同様にして、製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (90 mg, 258 μ mol)、メタクリルアミド (197 mg, 2.32 mmol)、グリセロール ジメタクリレート (10.5 μ l, 43.8 μ mol; 架橋剤濃度約1.7%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 4.2 mg) および1, 4-ジオキサン (750 μ l) を用いて、樹脂I (99 mg) を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約0.79 μ mol/mgのアミノ基が存在することを確認した。

10 製造例25：FK506付樹脂I：樹脂I-FKの合成



製造例24で調製した樹脂I(13mg、遊離アミノ基(available amino group)は10 μ mol)より製造例11に述べた方法に準じ、目的とするFK506付樹脂I(樹脂I-FK)を得た。

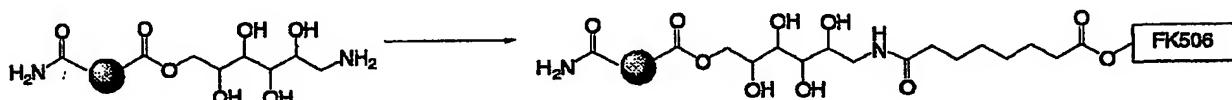
15 製造例2.6：メタクリルアミドとの共重合による樹脂Jの合成



樹脂J

製造例8と同様にして、製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (150 mg, 429 μmol)、メタクリルアミド (329 mg, 3.86 mmol)、グリセロール ジメタクリレート (17.5 μl , 73.0 μmol ; 架橋剤濃度約1.7%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 7.1 mg) および1, 4-ジオキサン (750 μl) を用いて、樹脂J (62 mg)を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約1.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ のアミノ基が存在することを確認した。

10 製造例27：FK506付樹脂J：樹脂J-FKの合成



樹脂J

樹脂J-FK

製造例26で調製した樹脂J (8.3 mg、遊離アミノ基 (available amino group) は10 μmol) より製造例11に述べた方法に準じ、目的とするFK506付樹脂J (樹脂J-FK)を得た。

15 製造例28：PEG型親水性モノマーの合成

(1) O-(2-フタルイミドエチル) ペンタエチレングリコールの合成

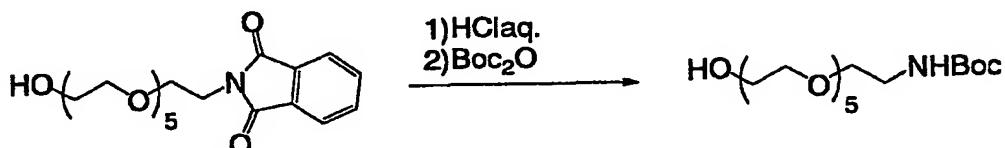


フタルイミド (31. 3 g, 213 mmol) にテトラヒドロフラン (600 ml), ヘキサエチレングリコール (50 g, 177 mmol) 及びトリフェニルホスフィン (55. 7 g, 213 mmol) を加えた。氷冷下、ジイソプロピルアゾカルボキシレート (40% トルエン溶液, 98. 5 ml, 195 mmol) を滴下した後、室温で終夜攪拌した。反応液を濃縮し、残渣に酢酸エチルを加え不溶物をろ過した。ろ液に飽和食塩水を加え、二層分離後、水層を酢酸エチルで抽出し、有機層をまとめた。得られた有機層は無水硫酸ナトリウムで乾燥した。固体物をろ過、減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し (酢酸エチル:アセトン = 4:1 で溶出)、目的とする O-(2-フタルイミドエチル) ペンタエチレングリコール (32. 7 g, 45%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3. 58–3. 69 (18H, m), 3. 71–3. 75 (4H, m), 3. 90 (2H, t), 7. 71 (2H, dd), 7. 85 (2H, dd).

MS (m/z): 412. 2 (MH⁺)

(2) O-(2-tert-ブロキシカルボニルアミノエチル) ペンタエチレングリコールの合成



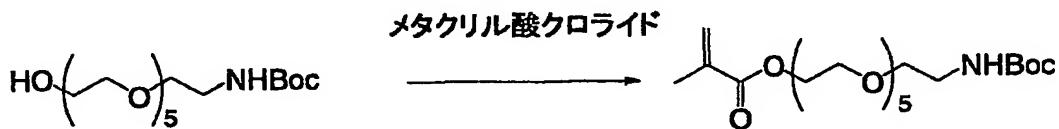
上記 (1) で調製した O-(2-フタルイミドエチル) ペンタエチレングリコール (8. 13 g, 19. 8 mmol) に 8N 塩酸水 (25 ml) を加え、5 時間加熱還流させた。放冷後、不溶物をろ過し、得られた水溶液をクロロホルム及び酢酸

エチルで洗浄した。得られた水層にジオキサン（80ml）を加えた後、水酸化ナトリウム水溶液でpH9～10に調整しながら、ジ-tert-ブチルジカルボナート（5.19g, 23.8mmol）を加えた。室温で1時間攪拌した後、反応液を減圧濃縮しジオキサンを留去した。残った水溶液は酢酸エチルで抽出し、得られた有機層をまとめ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。固体物をろ過、減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し（酢酸エチル：アセトン=1:0～1:1で溶出）、目的とするO-（2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル）ペンタエチレングリコール（4.66g, 62%）を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.44 (9H, s), 3.32 (2H, t), 3.54 (2H, t), 3.60-3.69 (18H, m), 3.73 (2H, t), 5.22 (1H, b s).

MS (m/z): 382.2 (MH⁺)

(3) O-（2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル）-O-（2-メタクリロイルオキシエチル）テトラエチレングリコールの合成



15

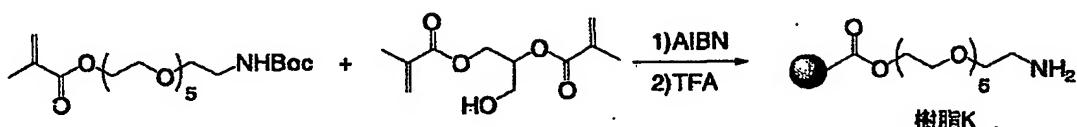
上記（2）で調製したO-（2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル）ペンタエチレングリコール（4.66g, 12.2mmol）にジエチルエーテル（150ml）を加えた。次いで、ピリジン（3.7ml）及びメタクリル酸クロライド（2.37ml, 24.5mmol）を加え、約1日攪拌した。ハイドロキノン（0.8g）と酢酸エチルを加えた後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、2Nクエン酸水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。固体物をろ過、減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し（酢酸エチルで溶出）、目的とするO-（2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル）-O-（2-メタクリロイルオキシエチル）テトラエチレングリコール（4.

4.6 g, 81%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.44 (9H, s), 1.95 (1H, t), 3.30 (2H, t), 3.54 (2H, t), 3.60-3.68 (16H, m), 3.75 (2H, t), 4.30 (2H, t), 5.06 (1H, b s), 5.57 (1H, t), 6.13 (1H, b s).

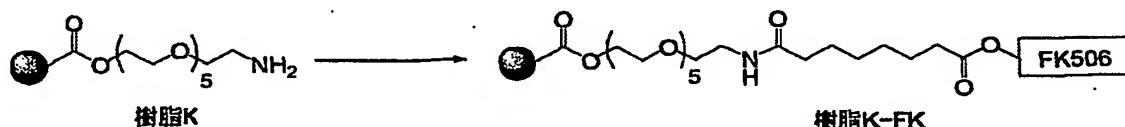
MS (m/z): 467.3 (MNa⁺)

製造例29：樹脂Kの合成



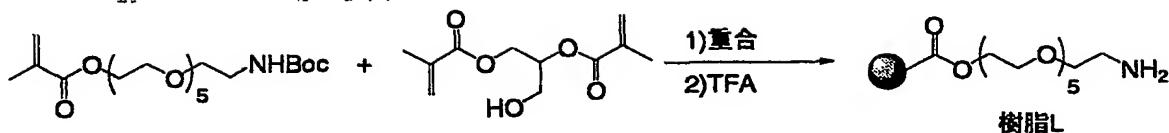
製造例28で調製したO-(2-tert-ブトキカルボニルアミノエチル)-O-(2-メタクリロイルオキシエチル)テトラエチレングリコール (2.12 mg, 0.484 mmol)、1,4-ジオキサン (4.24 μl)、グリセロールジメタクリレート (11.6 μl, 0.048 mmol)；架橋剤濃度10% およびアゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 0.8 mg) より、製造例8と同様にして、目的とする樹脂K (1.22 mg)を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約3.8 μmol/mgのアミノ基が存在することを確認した。

製造例30：FK506付樹脂K：樹脂K-FKの合成（溶液重合）



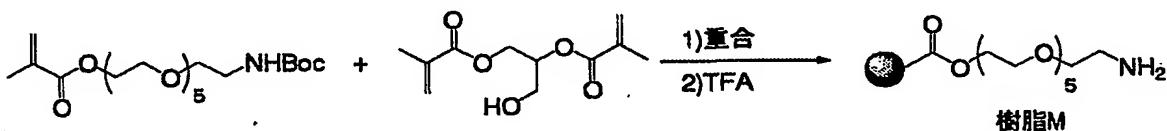
製造例29で調製した樹脂K (2.6 mg、遊離アミノ基 (available amino group) は3.8 μmol) より製造例11に述べた方法に準じ、目的とするFK506付樹脂K (樹脂K-FK)を得た。

製造例31：樹脂Lの合成（乳化重合）



5 製造例28で調製したO-(2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル)-O-(2-メタクリロイルオキシエチル)テトラエチレングリコール(188mg, 0.418mmol)の酢酸ブチル溶液(98mg)に、グリセロールジメタクリレート(2.01μl, 0.008mmol; 架橋剤濃度約1.9%)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(54mg)一過硫酸アンモニウム(1mg)水溶液(5.4ml)を加えた後、良く攪拌し乳化状態とした。70℃で終夜攪拌後、水、DMF、ジオキサンでよく洗浄した。次いで、トリフルオロ酢酸:1,4-ジオキサン=2:1混合溶液40mlを加え、室温で終夜攪拌した。反応10 終了後、樹脂を1,4-ジオキサン、DMFで十分洗浄し、さらに炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、水、DMFで十分に洗浄した後、樹脂Lを得た。

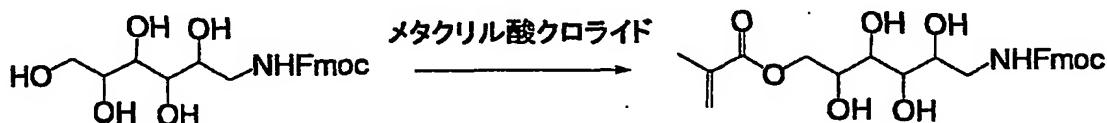
15 製造例32:樹脂Mの合成(懸濁重合)



15 製造例28で調製したO-(2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル)-O-(2-メタクリロイルオキシエチル)テトラエチレングリコール(188mg, 0.418mmol)の酢酸ブチル溶液(98mg)に、グリセロールジメタクリレート(2.01μl, 0.008mmol; 架橋剤濃度約1.9%)、ポリビニルアルコール[1000、完全けん化型]水溶液(51mg/2.6ml)及び炭酸カルシウム(14mg)を加えた。激しく攪拌しながら、70℃で1.5時間、さらに80℃で1.5時間反応させた。次いで、水、DMF、ジオキサンでよく洗浄した後、トリフルオロ酢酸:ジクロロメタン:1,4-ジオキサン=2:1:

1 混合溶液 4.0 ml を加え、室温で 1. 5 時間攪拌した。反応終了後、樹脂を 1, 4-ジオキサン、DMF で十分洗浄した後、5%ジイソプロピルエチルアミン/DMF 溶液中、室温で終夜攪拌した。次いで、DMF、メタノールで十分に洗浄した後、樹脂 M を得た。

5 製造例 33：親水性モノマーの合成：メタクリル酸 6-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシルエステルの合成

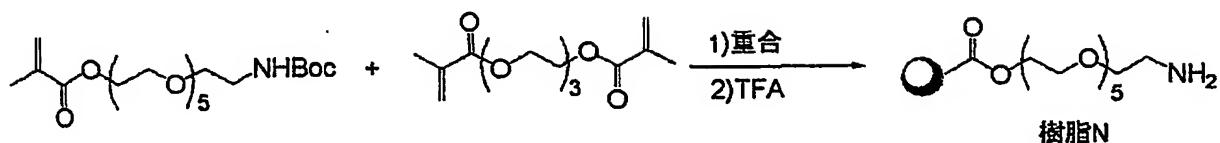


10 製造例 7 で調製した Fmoc-D-グルカミン (1.0 g, 24.9 mmol) に
無水ピリジン (3.00 ml) を加え、氷冷下メタクリル酸クロライド (3.8 ml, 40.0 mmol) を滴下した後、室温で終夜攪拌した。氷冷下、メタノール (1.00 ml) を加えた後、濃縮した。残渣を酢酸エチルに溶かし、飽和食塩水で洗浄した後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させた。固形物をろ過、減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムで精製後 (クロロホルム:メタノール = 1.0 : 1.0 で溶出)、メタノール-ジエチルエーテルより結晶化を行い、目的とするメタクリル酸 6-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシルエステル (2.29 g, 22.1%) を得た。

20 ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.95 (3H, s), 3.16 (1H, b s), 3.35-3.40 (3H, m), 3.68-3.72 (3H, m), 3.82 (1H, b s), 3.88 (1H, m), 3.97 (1H, m), 4.17 (1H, t), 4.40 (2H, m), 5.37 (1H, b s), 5.61 (1H, s), 6.16 (1H, s), 7.30 (2H, t), 7.39 (2H, t), 7.56 (2H, d), 7.75 (2H, d).

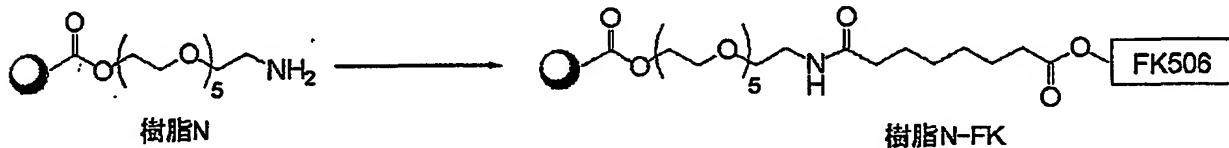
MS (m/z) : 472.2 (MH⁺)

製造例 3 4：樹脂Nの合成（乳化重合）



5 製造例 2 8 で調製したO-（2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル）-O-（2-メタクリロイルオキシエチル）テトラエチレングリコール（19.3 m
g, 0.429 mmol）に酢酸ブチル（16.6 μ l）、トリエチレングリコールジ
メタクリレート（49.2 μ l, 0.184 mmol；架橋剤濃度約43%）、ポリ
オキシエチレンソルビタンモノラウレート水溶液（79 mg / 79 ml）を加えた
後、良く攪拌し乳化状態とした。過硫酸アンモニウム（0.7 mg）を加え70°C
で終夜攪拌後、水、DMF、ジオキサンでよく洗浄した。次いで、トリフルオロ酢
酸：1, 4-ジオキサン：ジクロロメタン：水=50:35:10:5混合溶液1
4 mlを加え、室温で終夜攪拌した。反応終了後、樹脂を1, 4-ジオキサン、DMF
で十分洗浄し、さらに炭酸水素ナトリウム水溶液-DMF混合液で洗浄した後、
水-DMF混合液、DMFで十分に洗浄し樹脂Nを得た。なお、ニンヒドリン反応
により樹脂中に約0.350 mmol / mlのアミノ基が存在することを確認した。

10 製造例 3 5：FK506付樹脂N：樹脂N-FKの合成



15 製造例 3 4 で調製した樹脂N（遊離アミノ基：50 μ mol相当懸濁液）より製
造例 9（樹脂A-FK）に述べた方法に準じ、目的とするFK506付樹脂N（樹
脂N-FK）を得た。

20 実験例 1：結合実験

(1) lysateの調製

ラットの脳（2.2 g）を混合液A（0.25Mシュクロース, 25 mM Trisバッファー（pH 7.4), 22 ml）に混ぜ、ホモジネートを作成後、900

0 r p m で 1-0 分間遠心分離した。遠心分離上清を取り、5 0 0 0 0 r p m でさらに 15 分間遠心分離した。こうして得られた上清を 1 y s a t e として使用した。なお、実験はすべて 4°C あるいは氷上で行った。

(2) 結合実験

5 上記した FK 506 を結合した各種アフィニティー樹脂を用いて以下の手順で 1 y s a t e との結合実験を行った。なお、1 y s a t e は混合液 A で 1/2 に希釈して使用した。FK 506 付 TOYO パール樹脂、FK 506 付 Affi Gel 樹脂はそれぞれ 10 μl、樹脂 A-FK は 0.1 μm o l 相当分、並びに樹脂 B-FK～樹脂 J-FK は 1.0 μm o l 相当分を使用した。また、樹脂 N-FK は 1.0 μm o l 相当分を使用した。

10 FK 506 結合アフィニティー樹脂と 1 y s a t e (1 ml) を 4°C で終夜、静かに振とうした。その後、上清を除き、残った FK 506 結合アフィニティー樹脂を混合液 A で 4 回十分に洗浄して FK 506 結合アフィニティー樹脂表面を十分に洗浄した。

15 こうして得られた FK 506 結合アフィニティー樹脂に 20 μl の SDS 用 10 adding buffer (nakalai cat. NO=30566-22、電気泳動用 sample buffer solution with 2-ME (2-mercaptoethanol) (2x) for SDS PAGE) を加え、25°C で 10 分間加熱した。こうして得られたサンプル液を市販の SDS ゲル (BioRad ready Gel J, 15% SDS, cat. NO=161-J341) で分離し、その SDS ゲルを解析した。解析には SCANNER J X330 (SHARP) および ImageMaster version 2.01 (Pharmacia Biotech) を用い、比較例である製造例 3 の FK 506 付 TOYO パール樹脂に結合 (吸着) した分子の内、FKBP12 (バンド 4) を含む代表的な 4 種類のバンド (バンド 1～バンド 4) を選択し、そのピークの量を各製造例および比較例の樹脂について測定し、バンド 4 での値を基準値 (1.0) として相対的に定量化した (樹脂 A-FK～樹脂 J-FK については結果を図 1 に

示す)。別に行ったウエスタンプロットによりバンド4がFK506のターゲット分子、FKB P12であることを確認した。

FKB P12以外の残りの3つのバンドはそれぞれチューブリン(バンド1)、アクトinin(バンド2)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(バンド3)に相当し、FK506付TOYOパール樹脂に非特異的に結合(吸着)している。
5 樹脂A-FK～樹脂J-FKについては図1から示されるようにいずれのタンパク質も本発明の樹脂を使用することにより顕著にその非特異的な固相表面への結合(吸着)が抑制され、FK506付AffiGel樹脂を用いた場合と同程度にまで非特異的吸着が低減化されている。また樹脂N-FKについても非特異的吸着が
10 顕著に抑制されていた。

産業上の利用可能性

本発明の、親水性スペーサーを組み込んだモノマー成分を重合してなる樹脂、および当該樹脂にリガンドを固定化することによって得られるリガンド固定化固相担体は、試料中に混在する、当該リガンドに対するターゲット分子以外の物質の樹脂および/またはリガンドへの非特異的な吸着を低減化することができる。したがつてよりノイズの少ないターゲット分子の探索、同定等が可能になる。
15

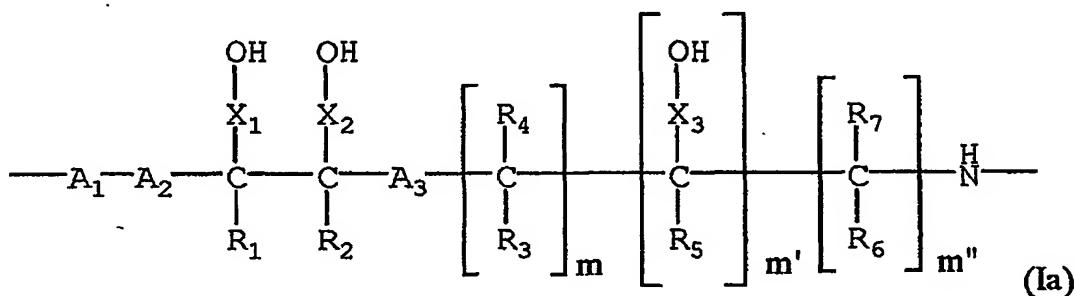
本出願は、日本で出願された特願2003-357144及び特願2004-178808を基礎としておりそれらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. 原料となるモノマーを重合して得られる樹脂であって、該モノマーには親水性スペーサーが組み込まれていることを特徴とする樹脂。

5 2. モノマーが（メタ）アクリル系モノマーである、請求項1記載の樹脂。

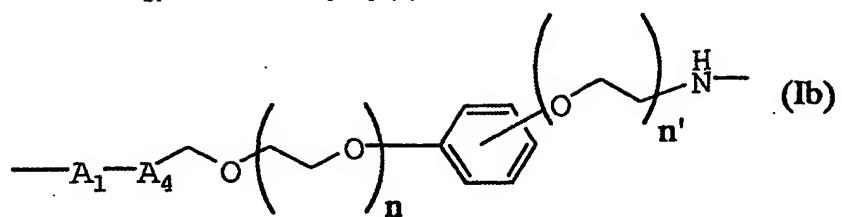
3. 親水性スペーサーが下記式（I a）～（I e）からなる群より選択されるいづれか1つの式で表される部分構造を少なくとも1つ有するものである、請求項1または2記載の樹脂。



10 (式（I a）中、
 A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、 A_2 は単結合または低級アルキレン基であり、
 A_3 は適当な連結基であり、
 X_1 ～ X_3 はそれぞれ同一または異なって単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、
 R_1 ～ R_7 はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-CH_2OH$ あるいは水酸基であり、
 m は0～2の整数であり、 m' は0～10の整数であり、 m'' は0～2の整数であり、
 R_3 ～ R_7 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよく、 X_3 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよい；

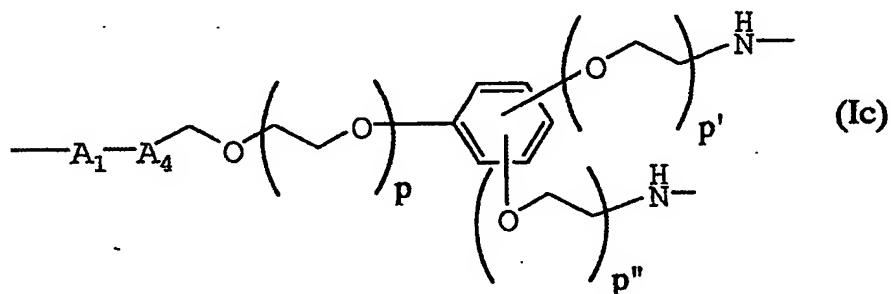
15

20



(式 (Ib) 中、

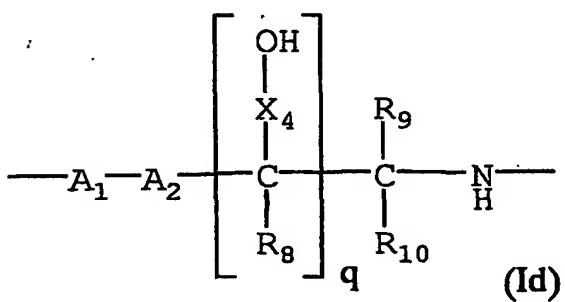
A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、 A_4 は低級アルキレン基であり、
 n および n' はそれぞれ同一または異なって 1 ～ 10 の整数である)；



5

(式 (Ic) 中、

A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、 A_4 は低級アルキレン基であり、
 p 、 p' および p'' はそれぞれ同一または異なって 1 ～ 10 の整数である)；



10 (式 (Id) 中、

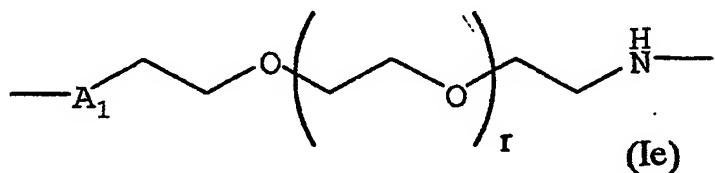
A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、 A_2 は単結合または低級アルキレン基であり、
 X_4 は単結合あるいは炭素数 1 ～ 3 の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換され
ていてもよいメチレン基であり、

$R_8 \sim R_{10}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数 1 ~ 3 の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-CH_2OH$ あるいは水酸基であり、

q は 1 ~ 7 の整数であり、

R_8 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよく、 X_4 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよい) ;

5

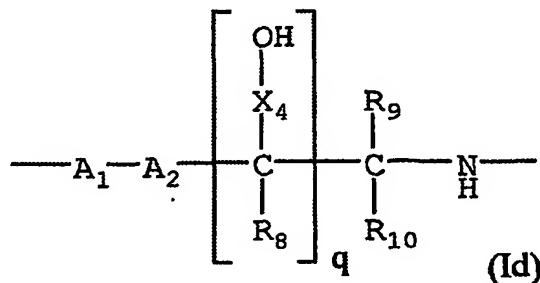


(式 (I e) 中、

A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、

r は 1 ~ 10 の整数である)

10 4. 親水性スペーサーが下記式 (Id) で表される部分構造を少なくとも 1 つ有するものである、請求項 3 記載の樹脂。



(式 (I d) 中、

A_1 は $-O-$ または $-NH-$ であり、 A_2 は単結合または低級アルキレン基であり、

15 X_4 は単結合あるいは炭素数 1 ~ 3 の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されてもよいメチレン基であり、

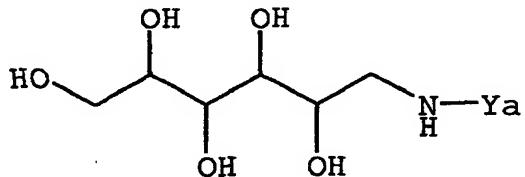
$R_8 \sim R_{10}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数 1 ~ 3 の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-CH_2OH$ あるいは水酸基であり、

q は 1 ~ 7 の整数であり、

R_8 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよく、 X_4 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なっていてもよい)

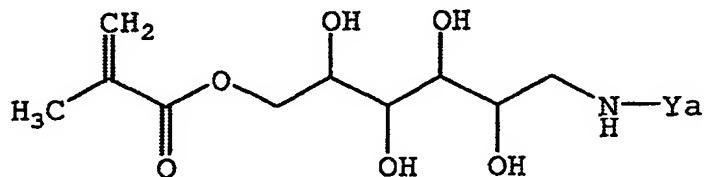
5. 式 (I d) において、 A_1 が—O—であり、 A_2 がメチレン基であり、 X_4 が単結合であり、 q が4であり、複数個存在する R_8 が同一で水素原子であり、 R_9 および R_{10} が水素原子である、請求項4記載の樹脂。

6. 親水性スペーサーが、下記式で表される化合物である、請求項1記載の樹脂。



(式中Yaは水素原子またはアミノ基の保護基である)

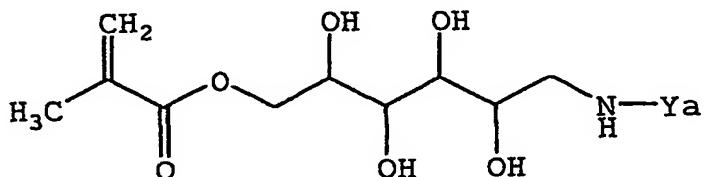
7. 下記式で表される化合物の共重合体を含む、請求項5記載の樹脂。



10

(式中Yaは水素原子またはアミノ基の保護基である)

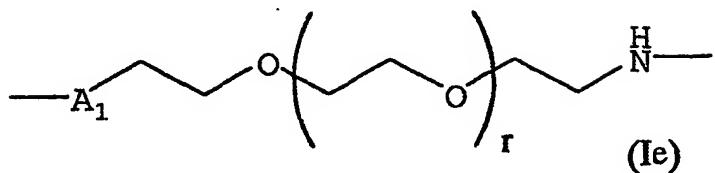
8. 下記式で表される化合物。



(式中Yaは水素原子またはアミノ基の保護基である)

15 9. 親水性スペーサーが下記式 (I e) で表される部分構造を少なくとも1つ有す

るものである、請求項 3 記載の樹脂。



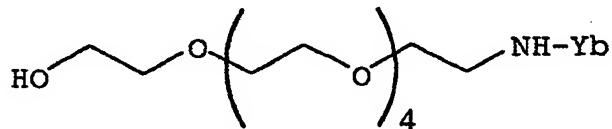
(式 (I e) 中、

A_1 は $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ であり、

5 r は 1 ~ 10 の整数である)

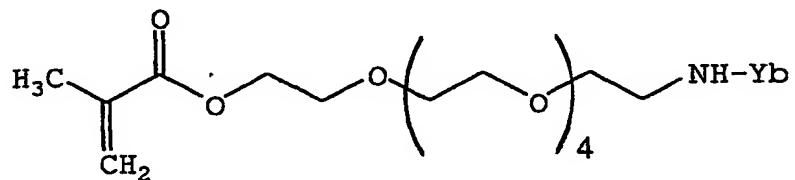
10. 式 (I e) において、 A_1 が $-\text{O}-$ である、請求項 9 記載の樹脂。

11. 親水性スペーサーが、下記式で表される化合物である、請求項 1 記載の樹脂。



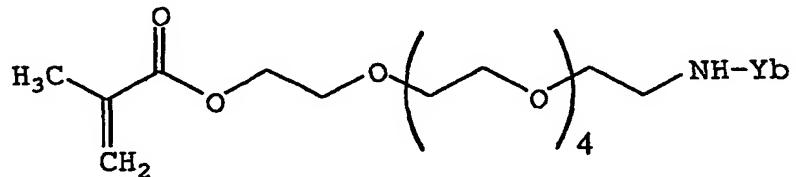
(式中 Y_b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

10 12. 下記式で表される化合物の共重合体を含む、請求項 10 記載の樹脂。



(式中 Y_b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

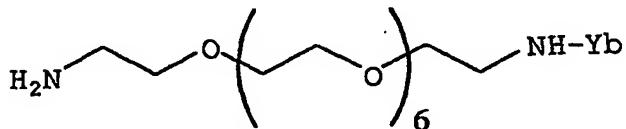
13. 下記式で表される化合物。



15 (式中 Y_b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

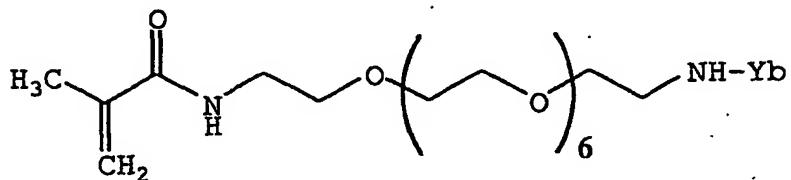
14. 式 (I-e) において、 A_1 が $-NH-$ である、請求項 9 記載の樹脂。

15. 親水性スペーサーが、下記式で表される化合物である、請求項 1 記載の樹脂。



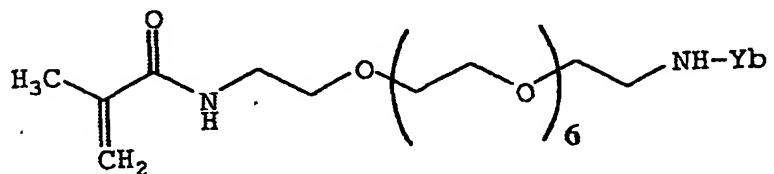
(式中 Yb は水素原子またはアミノ基の保護基である)

5 16. 下記式で表される化合物の共重合体を含む、請求項 14 記載の樹脂。



(式中 Yb は水素原子またはアミノ基の保護基である)

17. 下記式で表される化合物。



10 (式中 Yb は水素原子またはアミノ基の保護基である)

18. 請求項 1～7、9～12 および 14～16 のいずれか 1 項に記載の樹脂にリガンドを固定化してなる、アフィニティクロマトグラフィー用固相担体。

19. 該リガンドのターゲット分子探索用である、請求項 18 記載の固相担体。

20. リガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子のスクリーニング方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法：

(i) リガンドを請求項 1～7、9～12 および 14～16 のいずれか 1 項に記載

の樹脂に固定化する工程、

(i i) ターゲット分子を含むかまたは含まない試料を上記 (i) で得られたリガンドが固定化された樹脂に接触させる工程、

5 (i i i) リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかつた分子を同定し、解析する工程、および

(i v) 上記 (i i i) で得られた解析結果に基づいてリガンドに対して特異的な相互作用を有する分子をターゲット分子と判断する工程。

21. 試料中の、リガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子を測定する方法であつて、少なくとも以下の工程を含む方法：

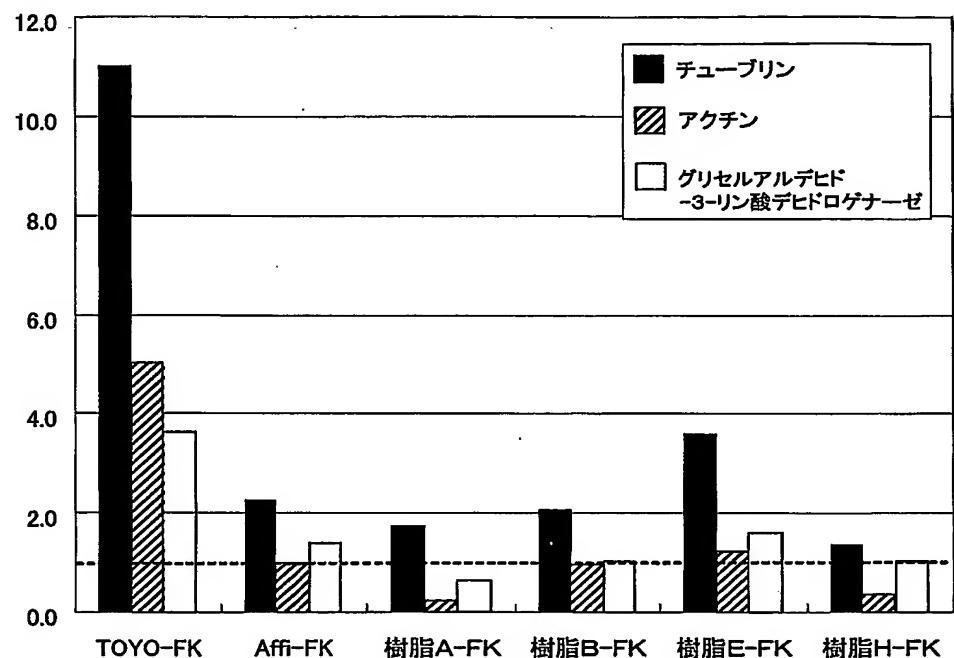
10 (i) リガンドを請求項 1～7、9～12 および 14～16 のいずれか 1 項に記載の樹脂に固定化する工程、

(i i) 試料を上記 (i) で得られたリガンドが固定化された樹脂に接触させる工程、

15 (i i i) リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかつた分子を同定し、解析する工程、および

(i v) 上記 (i i i) で得られた解析結果に基づいてリガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子を測定する工程。

図 1



各FKBP12を基準(1.0)とした時の主要非特異的バンドの比較

樹脂A-FK: FK506 (0.1eq) 付ポリOH型モノマー
 樹脂B-FK: FK506 付ポリOH型モノマー + メタクリル酸エチル (1:9) 共重合樹脂、架橋剤10%
 樹脂E-FK: FK506 付ポリOH型モノマー + メタクリル酸メチル (1:9) 共重合樹脂、架橋剤10%
 樹脂H-FK: FK506 付ポリOH型モノマー + メタクリルアミド (1:9) 共重合樹脂、架橋剤10%

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C08F220/16, 220/34, G01N30/48, 33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C08F220/00-220/60

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 05-023395 A (Toyobo Co., Ltd.), 02 February, 1993 (02.02.93), Claims; Par. Nos. [0016], [0021], [0032] (Family: none)	1-3, 9-12, 14-21
X	JP 06-256434 A (Mitsui Petrochemical Industries, Ltd.), 13 September, 1994 (13.09.94), Claims (Family: none)	1, 2, 18-21
X	JP 2003-231648 A (JSR Corp.), 19 August, 2003 (19.08.03), Claims; Par. No. [0031] (Family: none)	1, 2, 18-21

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 January, 2005 (05.01.05)Date of mailing of the international search report
25 January, 2005 (25.01.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/015659

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 05-311194 A (Nippon Shokubai Co., Ltd.), 22 November, 1993 (22.11.93), Claims (Family: none)	1-4
X	JP 63-105014 A (Japan Synthetic Rubber Co., Ltd.), 10 May, 1988 (10.05.88), Claims (Family: none)	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C08F 220/16, 220/34, G01N 30/48, 33/543

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C08F 220/00~220/60

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 05-023395 A (東洋紡績株式会社) 1993. 02. 02, 【特許請求の範囲】、【0016】、【0021】、【0032】 (ファミリーなし)	1-3, 9-12, 14-21
X	JP 06-256434 A (三井石油化学工業株式会社) 1994. 09. 13, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1, 2, 18-21
X	JP 2003-231648 A (ジェイエスアール株式会社) 2003. 08. 19, 【特許請求の範囲】、【0031】 (ファミリーなし)	1, 2, 18-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 01. 2005

国際調査報告の発送日

25. 1. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐々木 秀次

4 J 3236

電話番号 03-3581-1101 内線 3455

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	JP 05-311194 A (株式会社日本触媒) 1993. 1 1. 22, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-4
X	JP 63-105014 A (日本合成ゴム株式会社) 198 8. 05. 10, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-4